

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILA LÚCIA PAWLOSKI

ALISQUIRENO: UMA NOVA ESTRATÉGIA PARA O TRATAMENTO DA
PSORÍASE?

CURITIBA
2013

PRISCILA LÚCIA PAWLOSKI

ALISQUIRENO: UMA NOVA ESTRATÉGIA PARA O TRATAMENTO DA
PSORÍASE?

Dissertação desenvolvida no Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná durante o Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniela Cabrini de Almeida

CURITIBA
2013



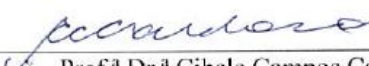
Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia




1 **ATA DO JULGAMENTO DA 88ª DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**
2 Ao vigésimo terceiro dia do mês de agosto do ano de dois mil e treze, às quatorze horas, no
3 Auditório do Departamento de Fisiologia, no Setor de Ciências Biológicas da Universidade
4 Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado de
5 autoria da pós-graduanda **PRISCILA LÚCIA PAWLOSKI**, intitulada "Alisquireno: uma
6 nova ferramenta para o tratamento da psoríase?", sob orientação do Prof. Dr. Michel Fleith
7 Otuki e composta pelos professores: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Presidente -
8 Farmacologia - UFPR); Prof.^a Dr.^a Cibele Campos Cardoso (Farmacologia – UFPR) e Prof.
9 Dr. Anderson Joel Martino Andrade (Fisiologia - UFPR). A Banca Examinadora iniciou os
10 trabalhos. A candidata teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho,
11 sendo em seguida arguida durante trinta minutos por cada um dos membros da Banca e
12 tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No final da sessão, a
13 Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer: aprovado. De acordo
14 com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-
15 graduanda foi aprovada. Para a publicação, o trabalho deverá sofrer as modificações
16 sugeridas, que serão conferidas por seu orientador. Nada mais havendo a tratar, o
17 Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada
18 pelo Presidente e pelos demais Membros da Banca Examinadora em Curitiba, 23 de agosto
19 de 2013.



Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Presidente - Farmacologia - UFPR)



Prof.ª Dr.ª Cibele Campos Cardoso (Farmacologia – UFPR)



Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade (Fisiologia - UFPR)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado coragem e estar sempre ao meu lado, manifestando Seu amor através das pessoas que fazem parte da minha vida;

Aos meus pais, Jairo e Lúcia, por serem meus maiores incentivadores, pelo amor incondicional, carinho e dedicação – vocês são meu porto seguro. Às minhas irmãs: Thaís, Lúgia e Patrícia, por tudo que representam na minha vida, pelo amor, companheirismo e apoio;

Ao meu amor Silvio, o meu ‘princeso’, por todo amor, carinho, paciência e otimismo. Ter você ao meu lado tornou tudo possível, mais leve e feliz;

Ao meu orientador Michel Otuki e co-orientadora Daniela Cabrini, pela orientação, confiança e oportunidades a mim dedicadas;

Aos meus colegas e amigos de laboratório da UFPR e UEPG, com os quais tive a honra de conviver: Camila, Andressa, Stefanie, Cíntia, Verlaine, Bruna, Luise, Graziela, Fernanda Lapa, Daniel, Arthur e Bruno. Obrigada Cíntia, além de amiga, você foi muito importante nesta caminhada, ensinando-me muito do que sei;

Em especial ao meu anjo da guarda, Camila Guimarães Moreira, minha ‘doutoranda de estimação’. Você foi muito mais que uma amiga, foi quem segurou minhas mãos para que só assim eu conseguisse chegar até aqui. Amo você Mila!

Às minhas amigas de mestrado Ellen Ogata Nomura e Verlaine Maturana, pela amizade e pelas conversas que muito me ajudaram;

À minha família de Araraquara-SP que tanto amo: Tia Ju, Lis Francini, Giuliana, Luciano, Carol e Mariano. Quando estamos juntos, tudo se torna muito melhor;

Às minhas amigas de tantos anos Dayane Cordeiro e Karem Pegoraro, apesar da distância vocês engrandecem e iluminam meu viver;

Aos professores da UEPG Daniel Fernandes, Carolina Bühner Ferreira Neto, Kátia Paludo e Michele Dietrich, pelos ensinamentos e amizade. Em especial à prof.^a Carolina, por ter sido a responsável pelo incentivo inicial;

E principalmente aos meus noninhos amados, Irineu e Maria (*in memoriam*), meus maiores exemplos de amor, fé e simplicidade. Vocês estarão presentes eternamente no meu coração e nas minhas melhores recordações.

*"Todo caminho da gente é resvaloso.
Mas também, cair não prejudica demais –
a gente levanta, a gente sobe, a gente volta!...
O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem"*

João Guimarães Rosa

RESUMO

A psoríase é uma doença inflamatória complexa mediada por diversos fatores, incluindo citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF)- α e IL-6, entretanto os mecanismos envolvidos não são completamente compreendidos. A angiotensina II (ANG II), o peptídeo ativo do sistema renina-angiotensina (RAS), pode estar envolvido em processos inflamatórios, como a cicatrização de feridas, a proliferação e reparação celular. Investigamos o efeito da inibição da renina no processo de proliferação de queratinócitos por alisquireno, um fármaco inibidor da renina. Através de um modelo de inflamação cutânea em camundongos, foram analisadas as respostas anti-inflamatórias e antiproliferativa após o tratamento por via oral com 30, 100 e 300 mg/kg de alisquireno. Observou-se uma redução dos níveis de citocinas, TNF- α e IL-6, e da atividade da mieloperoxidase (MPO), porém não houve efeito sobre o edema da orelha. O tratamento com 30 mg/kg de alisquireno foi capaz de reduzir os níveis de PCNA em análise de imunohistoquímica e Western blot. Os testes de toxicidade demonstraram que tratamentos com alisquireno não promoveram alterações em parâmetros como pressão sistólica, atrofia da pele, atrofia adrenal, peso do timo e linfonodo. Estes resultados demonstraram que o alisquireno é um agente anti-proliferativo eficaz no modelo experimental de inflamação cutânea em camundongos o que sugere que pode ser eficaz na terapia de doenças hiperproliferativas e inflamatórias da pele, como a psoríase.

Palavras-chave: Psoríase, Renina, Proliferação de queratinócitos, PCNA, Alisquireno

ABSTRACT

Psoriasis is a complex inflammatory disease mediated by several factors, including cytokines like tumor necrosis factor (TNF)- α and IL-6, but the mechanisms involved are not completely understood. Angiotensin II (ANG II), the most active peptide of the Renin-Angiotensin System (RAS), may be involved in the inflammatory processes, like wound healing, cell proliferation and tissue repair. We investigated the effect of renin inhibition in the process of keratinocytes proliferation by Aliskiren, a renin inhibitor drug. In a chronic skin inflammation model in mice, it was analyzed the anti-inflammatory and antiproliferative responses after orally treatments with 30, 100 and 300 mg/kg of aliskiren. It was observed a reduction of cytokines levels, TNF- α and IL-6, and of myeloperoxidase (MPO) activity, but no effect was found on ear thickness. The treatment with 30 mg/kg of aliskiren was able to reduce PCNA levels in immunohistochemistry and Western blot analysis. Toxicity tests had shown that aliskiren treatments promoted no change in parameters like alterations in the systolic blood pressure, skin atrophy, adrenal atrophy, in the thymus and lymph node weight. These results showed that aliskiren is an effective antiproliferative agent in the experimental model of chronic skin inflammation in mice which suggests that it could be effective in the therapy of inflammatory and hyperproliferative skin disorders, such as psoriasis.

Key-words: Psoriasis, Renin, Skin proliferation, PCNA, Alisquiren

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Camadas da pele	13
Figura 2 -	Camadas da epiderme	15
Figura 3 -	Estrutura epidérmica e diferenciação dos queratinócitos	16
Figura 4 -	Formação e evolução das placas psoriáticas.....	23
Figura 5 -	O Sistema Renina-Angiotensina (SRA).....	28
Figura 6 -	Estratégias de inibição do SRA.....	32
Figura 7 -	Fórmula estrutural do alisquireno	33
Figura 8 -	Desenho Experimental da inflamação cutânea estabelecida através da indução com óleo de cróton	38
Figura 9 -	Desenho experimental da avaliação de toxicidade a partir do tratamento com alisquireno ou dexametasona.....	39
Figura 10 -	Efeito do alisquireno no edema induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton	45
Figura 11 -	Efeito do alisquireno e da dexametasona, administrados via oral, na atividade das enzima MPO (A) e NAG (B) induzidos pela aplicação múltipla de óleo de cróton.	47
Figura 12 -	Dosagem de citocinas IL-6 (A) e TNF- α (B) em sobrenadantes de homogenatos de orelhas tratadas topicamente com óleo de cróton e posterior tratamento via oral com alisquireno (30, 100 ou 300 mg/kg) e Dexametasona (3 mg/kg).	48
Figura 13 -	Efeito do alisquireno e da dexametasona, administrados por via oral, sobre a migração leucocitária induzida pela aplicação múltipla de OC.....	48
Figura 14 -	Dosagem das citocinas IL-6 (A) e TNF- α (B) em sobrenadante de homogenatos de orelhas tratadas topicamente com OC e posterior tratamento por via oral com alisquireno (30, 100 ou 300 mg/kg) e Dexametasona (3 mg/kg)..	50
Figura 15 -	Fotos representativas da análise imunohistoquímica dos cortes histológicos de orelhas de camundongos, contracordados com HE após aplicação repetida de OC. (a) naive, (b) controle, (c)	

	tratamento com alisquireno na dose de 30 mg/kg, (d) 100 mg/kg e (e) 300 mg/kg.	50
Figura 16 -	Efeito do alisquireno e da dexametasona sobre a hiperproliferação epidermal induzida pela aplicação múltipla de OC.....	51
Figura 17 -	Avaliação do efeito do alisquireno nos níveis de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) em orelhas tratadas com OC.	51
Figura 18 -	Efeito do alisquireno na pressão sistólica	52
Figura 19 -	Avaliação da atrofia cutânea e no peso dos órgãos após tratamento com alisquireno (30, 100 e 300 mg/kg) ou Dexametasona (3 mg/kg) administrados por via oral através de gavagem por sete dias, duas vezes ao dia.	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ANG : Angiotensina

AMPs: Peptídeos antimicrobianos

AP-1 - Proteína Ativadora-1

cAMP – 3', 5' - Adenosina Monofosfato Cíclico

BSA - Albumina Bovina Fração V segundo Cohn

CEEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

COX - Cicloxigenase

DAB - Diamino-benzidina

Dexa - Dexametasona

EGF: Fator de crescimento epidermal

EPM - Erro Padrão da Média

ERK – Quinase Reguladora de Sinal Extracelular

HE - Hematoxilina-eosina

HTAB - Hexadeciltrimetilamônio

FDA: Food and Drug Administration

HLA: Antígeno leucocitário humano

ICAM-1: Molécula de adesão intercelular-1

IL: Interleucina

INF- γ : Interferon-gama

INF- α : Interferon-alfa

K (1, 2, 5, 10, 14, 16, 17): Queratina

KGF: Fator de crescimento de queratinócitos

LOX - Lipoxigenase

LT - Leucotrieno

LTB4 - Leucotrieno B4

MAPK - Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

mDO – mili-Densidade Óptica

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade

MPO - Mieloperoxidase

NAG - n-acetil- β -D glucosaminidase

NF-kB - Fator de Transcrição Nuclear – Kappa B

OC: Óleo de Cróton

PBS – Tampão Fostato de Sódio

PCNA: Antígeno nuclear de proliferação celular

PG - Prostaglandina

PGE2 - Prostaglandina E2

PKC - Proteína Quinase C

PLA₂ - Fosfolipase A₂

PMN – Polimorfonucleares

RPR: Receptor de pró-renina/renina

SFB: Soro fetal bovino

SRA: Sistema renina-angiotensina

TGF- α : Fator de crescimento transformante-alfa

TGF- β : Fator de crescimento transformante-beta

TMB - Tetrametilbenzidina

TNF- α : Fator de necrose tumoral- α

TPA: 12-O-tetradecanoilforbol acetato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1. PELE	12
1.2. PSORÍASE	18
1.2.1. IMUNOPATOGENESE E ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS	20
1.2.2. TRATAMENTOS UTILIZADOS PARA PSORÍASE	24
1.3. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA)	27
1.4. ALISQUIRENO	33
2. OBJETIVOS	35
2.1. OBJETIVOS GERAIS	35
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. DROGAS E REAGENTES	36
3.2. ANIMAIS	36
3.3. INFLAMAÇÃO CUTÂNEA INDUZIDA PELA APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE ÓLEO DE CRÓTON E AVALIAÇÃO DO EDEMA DE ORELHA	37
3.4. AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA ATRAVÉS DE <i>TAIL CUFF</i>	38
3.5. TOXICIDADE DO ALISQUIRENO ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DE ATROFIA CUTÂNEA E DO PESO DE ÓRGÃOS	39
3.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE (MPO) E DA N-ACETIL-B-D GLUCOSAMINIDASE (NAG)	39
3.7. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS	40
3.8. ANÁLISE HISTOLÓGICA	41
3.9. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	42
3.10. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DA PROTEÍNA PCNA PELO ENSAIO DE <i>WESTERN BLOTTING</i>	42
3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	43

4. RESULTADOS	45
4.1. EFEITO DO ALISQUIRENO NO EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE ÓLEO DE CRÓTON	45
4.2. ALISQUIRENO REDUZ A ATIVIDADE DA MPO, MAS NÃO ALTERA A ATIVIDADE DA NAG	46
4.3. ALISQUIRENO REDUZ OS NÍVEIS DE TNF-A E IL-6	49
4.4. ALISQUIRENO REDUZ O ESPESSAMENTO DA EPIDERME E OS NÍVEIS DE PCNA	49
4.5. EFEITO DO ALISQUIRENO NA PRESSÃO SISTÓLICA	52
4.6. EFEITO DO ALISQUIRENO EM ENSAIO DE TOXICIDADE	52
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

De acordo com dados epidemiológicos, a psoríase afeta cerca de 1 a 3% da população mundial (JACOBSON, KUMAR e KIMBALL, 2011). Essa doença inflamatória da pele é caracterizada por lesões com placas bem demarcadas, elevadas, eritematosas e cobertas com escamas prateadas sobrepostas em determinadas regiões do corpo, dependendo do grau e tipo da doença. Sabe-se que existem muitos fatores envolvidos na etiopatogenia da doença, mas apesar da evolução das pesquisas científicas envolvendo a psoríase, sua causa ainda permanece pouco elucidada (NESTLE, KAPLAN e BARKER, 2009).

Os tratamentos atualmente utilizados para a redução da sintomatologia da doença apresentam diversos efeitos colaterais, especialmente quando utilizados de maneira crônica (AFIFI *et al.*, 2005). E, por essa característica, existe um interesse crescente em se desvendar possíveis novos componentes ou vias envolvidas nesse processo de desenvolvimento da psoríase e os quais possam representar um possível alvo alternativo para o tratamento desses pacientes.

A renina, uma protease produzida pelo rim, está envolvida no processo de regulação da pressão arterial, juntamente com outras moléculas do organismo (LIZAKOWSKI, TYLICKI e RUTKOWSKI, 2013). Porém, além dessa função, evidências apontam que a renina pode estar também envolvida com o processo de regulação da proliferação celular na pele (SUAREZ-FARINAS *et al.*, 2012; JADHAV, S. S. *et al.*, 2013). O alisquireno é um medicamento utilizado para o tratamento da hipertensão arterial e sua ação ocorre através da inibição da renina (LUFT e WEINBERGER, 2008). Portanto, uma vez que a renina está envolvida nos processos proliferativos da pele, torna-se interessante investigar o uso de um inibidor como o alisquireno, como possível agente antiproliferativo nos distúrbios cutâneos.

1.1. Pele

A pele representa a primeira linha de defesa do corpo humano contra lesões e infecções. Com sua área aproximada de $1,8 \text{ m}^2$, é o maior órgão do corpo humano e representa 15% do peso corpóreo (DENNING, 2004). Constitui-se de uma complexa estrutura de tecidos de várias naturezas, dispostos e inter-relacionados de modo a adequar-se, de maneira harmônica, representando uma importante barreira física, bioquímica e imunológica contra estímulos patogênicos (MAKRANTONAKI e ZOUBOULIS, 2007).

É dividida em três camadas: a epiderme (camada mais externa), derme (camada intermediária) e hipoderme (camada mais interna) (Figura 1). A camada mais profunda, a hipoderme, possui espessura variável, composta exclusivamente por tecido adiposo. Relaciona-se em sua porção superior, com a derme profunda, constituindo-se a junção dermo-hipodérmica. Funcionalmente, a hipoderme além de depósito de reserva nutritiva, participa no isolamento térmico e na proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos e facilita a motilidade da pele em relação às estruturas adjacentes (BOUWSTRA *et al.*, 2003).

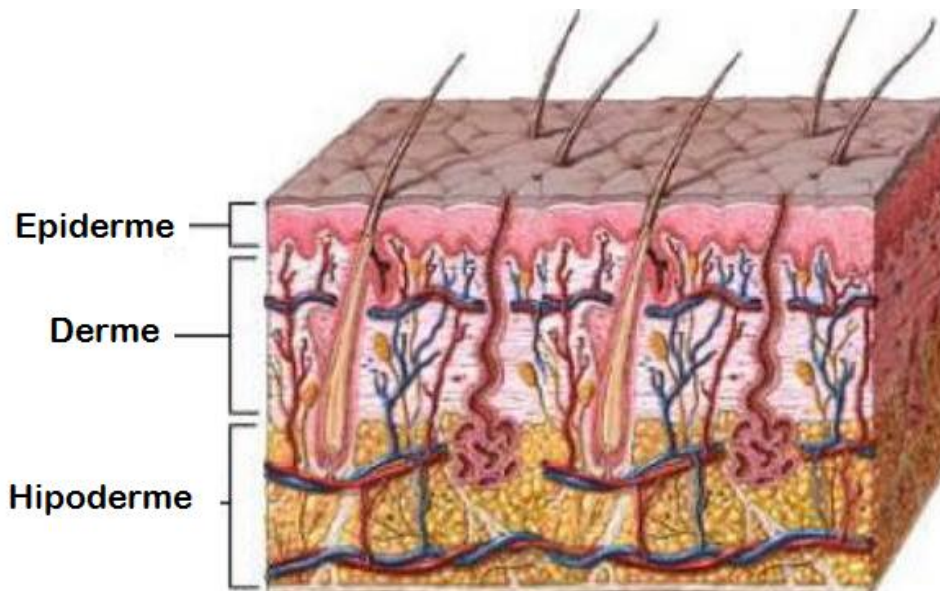


Figura 1: Camadas da pele.
Fonte: Adaptado de (LIU *et al.*, 2008)

A derme consiste num tecido conectivo, cuja espessura é superior ao da epiderme, porém com uma população celular inferior. Esta estrutura confere à pele elasticidade, força tênsil e resistência mecânica (BOUWSTRA *et al.*, 2003). Pode ser

dividida em duas camadas: (a) derme papilar, constituída por tecido conjuntivo frouxo contendo pequenas fibras de elastina e colágeno, bem como vasos sanguíneos e vasos linfáticos; e (b) derme reticular, localizada entre a derme papilar e o tecido celular subcutâneo, constituída por tecido conjuntivo denso, composto por fibras colágenas grossas, tornando-se assim uma zona responsável pela absorção de choques mecânicos. As fibras colágenas oferecem uma barreira mecânica e uma estrutura que acolhe vasos sanguíneos e células imunes, como, células dendríticas dérmicas, células T, células natural killer (NK), células B, mastócitos e macrófagos (DI MEGLIO, PERERA e NESTLE, 2011). A derme é drenada por canais linfáticos e vasculares, pelos quais as células migratórias podem trafegar. Na derme o principal tipo celular são os fibroblastos, os quais são responsáveis por produzir todos os componentes da matriz extracelular, desde o colágeno até as fibras elásticas, os quais conferem à pele elasticidade e tonicidade (NICKOLOFF, 2007).

A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso (CANDI, SCHMIDT e MELINO, 2005) e não possui vasos sanguíneos, entretanto, o fato de estar intimamente apoiada à derme através da membrana basal, permite que esta receba suporte sanguíneo e nutrientes da derme (MAKRANTONAKI e ZOUBOULIS, 2007). É subdividida em quatro camadas (Figura 2), cada uma com funções distintas. A camada ou estrato córneo atua como uma grande barreira à penetração de organismos externos e toxinas, além de prevenir a perda de água. No estrato granuloso, inicia-se o processo de cornificação, onde as células sofrem apoptose diferenciando-se em corneócitos (BOUWSTRA *et al.*, 2003). No estrato espinhoso, os queratinócitos presentes são responsáveis pela produção dos filamentos de queratina (queratinização), e por fim, a camada ou estrato basal, que é a camada mais profunda e responsável pela proliferação celular e renovação cutânea, sendo resistente ao processo apoptótico. Embora os queratinócitos representem as células primordiais, a epiderme é constituída de múltiplos tipos celulares que possuem diferentes origens embrionárias e funções. Aproximadamente 80-85% da epiderme é constituída de queratinócitos, 10-13 % de melanócitos, os quais são responsáveis pela produção de melanina, 4% de células de Langerhans e 1% de células de Merkel, as quais atuam nas respostas de defesa (KOSTER e ROOP, 2004).

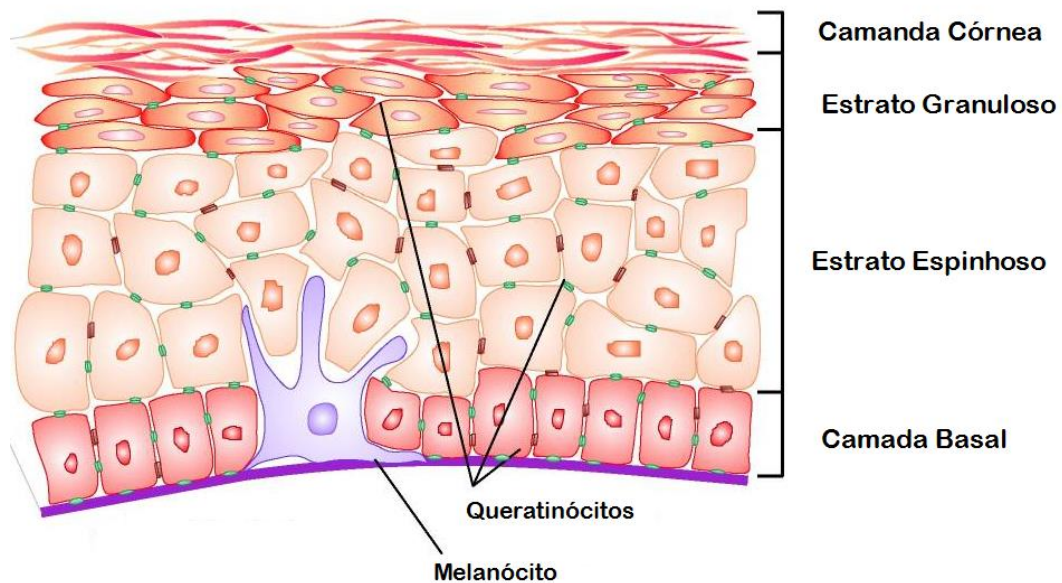


Figura 2: Camadas da epiderme.
 Fonte: Adaptado de (KERN, NIAULT e BACCARINI, 2011)

A manutenção do número de células na epiderme depende do balanço entre proliferação celular e morte celular (diferenciação/apoptose) dos queratinócitos. A epiderme tem a capacidade de auto-renovação tanto sob condições homeostáticas como em condições nocivas, devido à presença de uma população celular ativamente mitótica na camada basal. Em condições normais, a renovação epidérmica é balanceada pela descamação da camada córnea na superfície da pele, através do processo de queratinização e cornificação após uma diferenciação celular progressiva, a partir da camada basal em direção à superfície (FUCHS e RAGHAVAN, 2002; CANDI, SCHMIDT e MELINO, 2005).

A proliferação celular ocorre no estrato basal da epiderme o qual contém apenas uma camada de células epidérmicas indiferenciadas, composta por *stem cells* e células transitórias, conhecidas como queratinócitos basais. O processo proliferativo é regulado por proteínas celulares da fase G1 do ciclo celular, principalmente pela ativação de quinases dependentes de ciclinas (GNIADECKI, 1998). À medida que os queratinócitos migram da camada basal, adquirem gradualmente quantidades crescentes de queratina, e tornam-se gradativamente mais achatados (PROKSCH, BRANDNER e JENSEN, 2008).

Em cada estrato, os queratinócitos sofrem alterações fisiológicas e morfológicas expressando marcadores específicos necessários para levá-los à

camada superior. Esses marcadores são representados principalmente pelos diferentes tipos de queratinas (LATKOWSKI, FREEDBERG e BLUMENBERG, 1995; TOBIN, 2006). Queratinas pertencem a uma família de proteínas estruturais fibrosas, incluindo 28 membros do tipo I (ácido) e 26 do tipo II (básico). As queratinas são organizadas em heteropolímeros, isto é, uma proteína do tipo I e outra do tipo II formam um heterodímero. Cada par de queratinas é característica de um momento de diferenciação epitelial particular. Por exemplo, na epiderme, os queratinócitos basais expressam K5 (tipo II) / K14 (tipo I), enquanto que as células suprabasais expressam K1 (tipo II) / K10 (tipo I) (SZEVERENYI *et al.*, 2008).

Quando os queratinócitos deixam a camada basal, inicia-se o processo de diferenciação (DENNING, 2004). No estrato espinhoso, essas células mudam da forma colunar para poligonal devido ao grande número de desmossomos e em seguida, movem-se para o estrato granuloso onde produzem queratina, proteínas e lipídeos. Nos queratinócitos do estrato granuloso são expressas proteínas associadas com os estágios posteriores da diferenciação, como a profilagrina, filagrina, transglutaminase-I e precursores do envelope de cornificação como a involucrina e loricrina (Figura 3) (PROKSCH, BRANDNER e JENSEN, 2008).

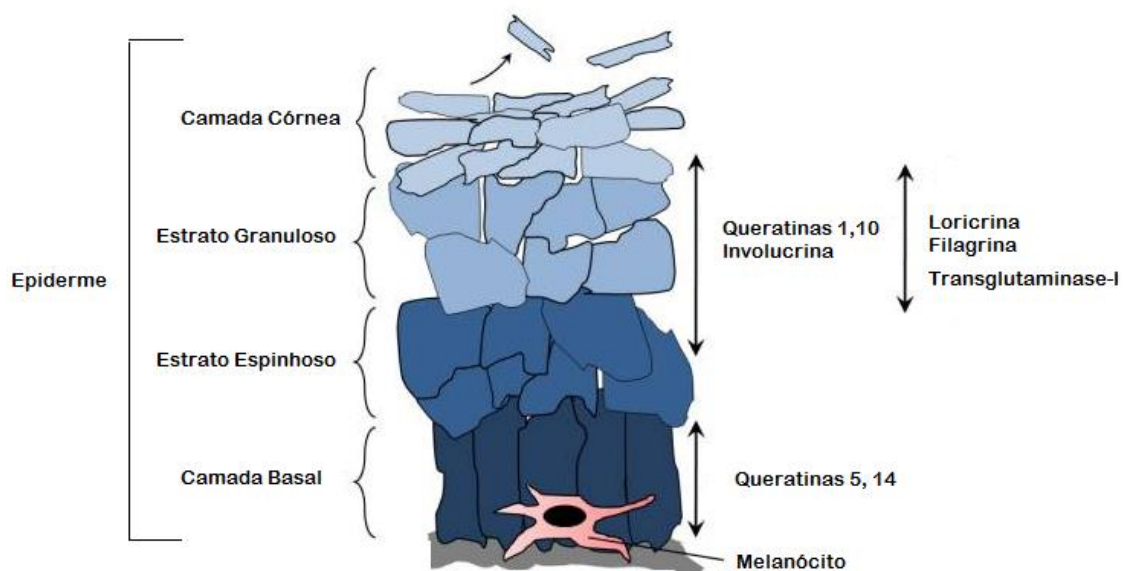


Figura 3: Estrutura epidérmica e diferenciação dos queratinócitos.
Fonte: Adpatado de (D'ORAZIO *et al.*, 2013)

Por fim, estas células migram para o estrato córneo, produto final da maturação dos queratinócitos. Esta é a camada responsável pela função de barreira da pele, que exclui diversos agentes tóxicos e previne a desidratação. As células nesta camada, conhecidas como corneócitos, são queratinócitos mortos, desprovidos de organelas e núcleo. Estas células anucleadas contêm no seu interior filamentos de queratina, que contribuem para a formação do citoesqueleto celular, e são circundadas por um envelope celular composto de proteínas com ligações cruzadas, o envelope cornificado (TOBIN, 2006; PROKSCH, BRANDNER e JENSEN, 2008). O fenômeno de proliferação e diferenciação leva aproximadamente 30 dias para ser concluído (LATKOWSKI, FREEDBERG e BLUMENBERG, 1995; DENNING, 2004; TOBIN, 2006). O balanço entre a proliferação e a diferenciação dos queratinócitos é essencial para que ocorra a construção de uma barreira funcional apropriada e eficiente (ECKERT *et al.*, 2002).

A interação coordenada entre os diferentes tipos celulares presentes nas camadas da pele permite que este órgão responda prontamente e efetivamente frente a uma variedade de estímulos nocivos que ocorrem na interface do organismo com o meio externo, como a ação de toxinas, organismos patogênicos, radiação ultravioleta e extremos de temperatura, garantindo assim a manutenção da homeostasia cutânea. E nesse contexto, a pele demonstra ser muito mais do que simplesmente uma barreira física passiva entre o meio externo e interno, mas também, indubitavelmente, uma extensão do sistema imunológico (DI MEGLIO, PERERA e NESTLE, 2011).

Os queratinócitos, além de formar uma barreira mecânica, exercem um papel dinâmico e crítico na iniciação, manutenção e regulação das respostas imunes da pele (DENNING, 2004). Estas células fazem parte do sistema imune inato e respondem a estímulos antigênicos de maneira rápida e não específica. Apesar de não serem clássicas células apresentadoras de antígenos, eles são capazes de processar e apresentar antígenos às células T (NESTLE, KAPLAN e BARKER, 2009; PERERA, DI MEGLIO e NESTLE, 2012). Muitas doenças comuns de pele, como psoríase, feridas cutâneas crônicas, queratose actínica e câncer de pele são causadas por distúrbios no crescimento e maturação dos queratinócitos (GNIADDECKI, 1998).

1.2. Psoríase

A psoríase está entre as principais doenças inflamatórias crônicas da pele, que afeta cerca de 1 a 3% da população mundial (JACOBSON, KUMAR e KIMBALL, 2011). O aparecimento dos sinais e sintomas é mais comum durante dois períodos da vida: entre os 15 e 25 anos e entre os 50 e 60 anos de idade (FEINGOLD e GRUNFELD, 2012). Apresenta maior incidência em populações americanas e canadenses (4,6-4,7%) do que em populações africanas e asiáticas (0,4-0,7%). Sua incidência parece ser fortemente influenciada por fatores climáticos e étnicos, embora essa relação ainda não seja compreendida (BHALERAO e BOWCOCK, 1998; CHRISTOPHERS, 2001; PERERA, DI MEGLIO e NESTLE, 2012).

Durante centenas de anos, a psoríase foi considerada uma forma de lepra (bem como todas as outras doenças descamativas) e, portanto, contagiosa. Somente em 1841, o dermatologista Ferdinand von Hebra definiu a psoríase como uma entidade distinta da lepra, dando-lhe o nome de psoríase com origem na palavra grega *psora*, que significa prurido (SCHON e BOEHNCKE, 2005). Porém, a população em geral e pacientes com menos acesso à informação, acreditam ainda que se trata de uma doença contagiosa, tornando mais pesado o fardo que esses pacientes carregam (SCHÖN e BOEHNCKE, 2005).

A etiologia da psoríase ainda não é totalmente elucidada. Embora a transmissão genética esteja claramente envolvida, somente a suscetibilidade genética não parece ser capaz de desencadear a doença, sendo necessário estímulos externos, como o estresse físico e psicológico, infecções, traumas, consumo de álcool e tabagismo. A prevalência da psoríase tem aumentado de maneira significativa entre as populações, possivelmente devido a mudanças no estilo de vida e fatores ambientais (CASSANO *et al.*, 2011; BRENAUT *et al.*, 2013; DANIELSEN *et al.*, 2013). A administração de algumas drogas também está relacionada com o aparecimento das lesões, como: lítio (BAKKER e PEPPLINKHUIZEN, 1976), betabloqueadores (ABEL *et al.*, 1986), inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) (THAKOR *et al.*, 2010) e anti-inflamatórios não esteroidais (BASAVARAJ *et al.*, 2010).

Algumas regiões cromossômicas foram associadas à psoríase incluindo o *locus* PSORS1 (GRIFFITHS e BARKER, 2007; LOWES, BOWCOCK e KRUEGER,

2007). Esse *locus* é o mais amplamente estudado, e localiza-se na região do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), no cromossomo 6p21, que contém genes que codificam proteínas relacionadas à função do sistema imune, entre eles, os genes do HLA (Antígeno leucocitário humano) (KRUEGER e ELLIS, 2005). HLA-Cw6 é considerado o maior determinante genético da psoríase. Porém, outros estudos mostram diversos genes de risco não relacionados com HLA, como por exemplo, IL-12B e IL-23R (LI e BEGOVICH, 2009).

Manifestações clínicas da psoríase incluem a presença de placas eritematosas elevadas, bem delimitadas, descamativas em formatos ovalados que ocorrem principalmente, em locais de grande tensão, por exemplo, onde a pele é esticada ou apresenta dobras. Clinicamente a psoríase se manifesta de forma bastante particular, permitindo classificar a doença em diversos tipos. A psoríase vulgar representa 90% dos casos e se manifesta com lesões nos cotovelos, joelhos, couro cabeludo, umbigo e região lombar. Os outros tipos são: gutata, pustular, invertida e eritematosa (JIN e WANG, 2013). A psoríase gutata se manifesta como pequenas lesões, de aproximadamente um centímetro, em forma de gotas espalhadas por todo o tronco (POTOK, PRAJAPATI e BARANKIN, 2011). A pustular é caracterizada por lesões com pústulas dolorosas especialmente nas mãos e nos pés enquanto a invertida acomete principalmente regiões de constante atrito, como axilas e região genital (IRLA, NAVARINI e YAWALKAR, 2012). A forma eritematosa, a mais severa, acomete grande parte da superfície corporal por lesões eritemato-escamosas e pode estar associada com sintomas graves como insuficiência cardíaca, representando risco de morte ao paciente (MUMOLI *et al.*, 2013). Quando essas lesões acometem as unhas, é chamada psoríase ungueal, na qual aparecem depressões puntiformes ou manchas amareladas principalmente nas unhas das mãos (GRIFFITHS e BARKER, 2007).

Pacientes com psoríase podem desenvolver ainda artrite psoriática, uma espondiloartrite caracterizada por inflamação das articulações que geram lesões articulares dolorosas e debilitantes, entesite e dactilite, além das manifestações cutâneas. Essa manifestação articular tem associação com a psoríase e é distinta da artrite reumatóide, sendo normalmente negativa para o fator reumatóide. As estimativas da prevalência da artrite psoriática em indivíduos com psoríase variam desde 6% até 42%, dependendo da população estudada (BOEHNCKE *et al.*, 2013).

Além disso, certos padrões de comorbidades podem ser encontrados com frequência, especialmente em casos graves, com uma longa história da doença. Entre as principais estão: obesidade, dislipidemias, resistência à insulina, distúrbios psicológicos, doenças cardiovasculares, hipertensão, e risco aumentado para infarto agudo do miocárdio (WOHLRAB *et al.*, 2013). A semelhança entre os processos de formação da placa de ateroma e na progressão da placa psoriática permite estabelecer uma relação com a incidência aumentada de doenças cardiovasculares nesses pacientes (LIMA EDE e LIMA MDE, 2011).

Apesar de ser uma doença relativamente comum, indivíduos portadores de psoríase, relatam algumas dificuldades significativas, capazes de alterar consideravelmente a qualidade de vida dos mesmos. A primeira delas é representada pelo incômodo que as lesões psoriáticas causam, seja pela característica descamativa ou por sintomas como dor ou coceira. Outra dificuldade enfrentada é a preocupação com a imagem transmitida às pessoas, já que muitas vezes as lesões aparecem em locais visíveis (PERERA, DI MEGLIO e NESTLE, 2012).

1.2.1. Imunopatogênese e alterações histopatológicas

Estudos acerca da resposta imunológica têm permitido uma nova definição da doença, sendo possível uma compreensão singular dos processos de regulação da inflamação na psoríase, mesmo que ainda não totalmente elucidados. Desta forma, atualmente há a certeza de que a gama de citocinas e mediadores inflamatórios que são sintetizados na pele lesionada é muito maior do que se admitiu no passado (BOWCOCK e KRUEGER, 2005).

Os eventos imunológicos que contribuem para a patogênese da doença envolvem a desregulação de mediadores celulares envolvidos na resposta imune capazes de modificar a estrutura da pele, levando a uma resposta inflamatória prolongada. Devido às muitas semelhanças entre o processo de re-epitelização e a psoríase, muitos pesquisadores consideram lesões psoriáticas como um processo de cicatrização prolongado (PERERA, DI MEGLIO e NESTLE, 2012).

O processo inflamatório observado na pele psoriática é resultado de uma estimulação persistente das células T por antígenos epidérmicos, com a participação tanto da imunidade inata quanto da adquirida. Como já descrito, diversos fatores ambientais são capazes de ativar o sistema imune inato através de células residentes como queratinócitos e células dendríticas (CD). Após esse estímulo, os queratinócitos secretam citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , as quais são capazes de ativar as CD, como as células de Langerhans. Esses estímulos também promovem a liberação de peptídeos antimicrobianos (AMPs), como o LL-37, ocorrendo a formação de um complexo LL-37-DNA que ativa as células dendríticas plasmocitóides, e a secreção de INF- α por estas. INF- α também ativa células dendríticas mielóides. Essas células por sua vez migram até o linfonodo mais próximo onde ativam linfócitos T, iniciando a ativação do sistema imune secundário (NESTLE, KAPLAN e BARKER, 2009; PERERA, DI MEGLIO e NESTLE, 2012).

Após a ativação das células dendríticas, inicia-se a cascata inflamatória, com a diferenciação dos linfócitos e consequente desenvolvimento da placa psoriática (LIMA EDE e LIMA MDE, 2011). Os principais linfócitos ativados na psoríase são linfócitos T *helper* TCD4+ tipo 1 (LTh1), tipo 17 (LTh17) e linfócitos T citotóxicos TCD8+ tipo 1 (LTc1). Essas células ativadas são capazes de sintetizar e liberar outras citocinas, dentre as quais estão: IL-2, TNF- α , INF- γ , além de fator estimulador de colônias de granulócitos e leucócitos (GM-CSF) e fator de crescimento epidérmico (EGF) (NESTLE, KAPLAN e BARKER, 2009; LIMA EDE e LIMA MDE, 2011).

Durante o processo de maturação, as células T produzem novas proteínas de superfície que habilitam sua passagem dos vasos para a pele, como o antígeno associado ao linfócito cutâneo (CLA), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão de células vasculares (VCAM-1), as quais contribuem para a quimiotaxia de linfócitos T e B, assim como de neutrófilos e macrófagos para a lesão, por ativação do endotélio vascular. Sendo assim, uma vez ativados, os linfócitos migram dos linfonodos para a pele onde ativam CD e macrófagos sustentando a ativação do sistema imune inato. As CD e macrófagos ativados secretam IL-12 e IL-23 que estimulam a proliferação de LTh1 e LTh17, respectivamente, estabelecendo assim, um ciclo vicioso de ativação do sistema imune (Figura 4) (SABAT *et al.*, 2007; PERERA, DI MEGLIO e NESTLE, 2012).

A presença de um grande número de CD mielóides na derme psoriática sugere que estas células podem desempenhar um papel crítico na psoríase (NESTLE, KAPLAN e BARKER, 2009). CD atuam como células apresentadoras de antígenos e liberam IL-20 que estimula a proliferação dos queratinócitos, e também óxido nítrico o qual promove vasodilatação. Secretam ainda IL-23, responsável pelo aumento da proliferação de LTh17 com consequente aumento na produção de IL22 e IL-6, as quais estimulam a proliferação dos queratinócitos. TNF- α induz a expressão de ICAM-1 dos queratinócitos e de VCAM-1 das células endoteliais, favorecendo e mantendo a diapedese linfocitária e a produção de mediadores pró-inflamatórios e quimioatraentes tais como IL-8, IL-6 e IL-1 (NESTLE, KAPLAN e BARKER, 2009; DI MEGLIO, PERERA e NESTLE, 2011). Na psoríase, o TNF também é sintetizado em macrófagos, queratinócitos e células de Langerhans intraepidérmicas e se distribui por toda a epiderme, preferencialmente junto aos vasos sanguíneos da parte superior da derme (LIMA EDE e LIMA MDE, 2011).

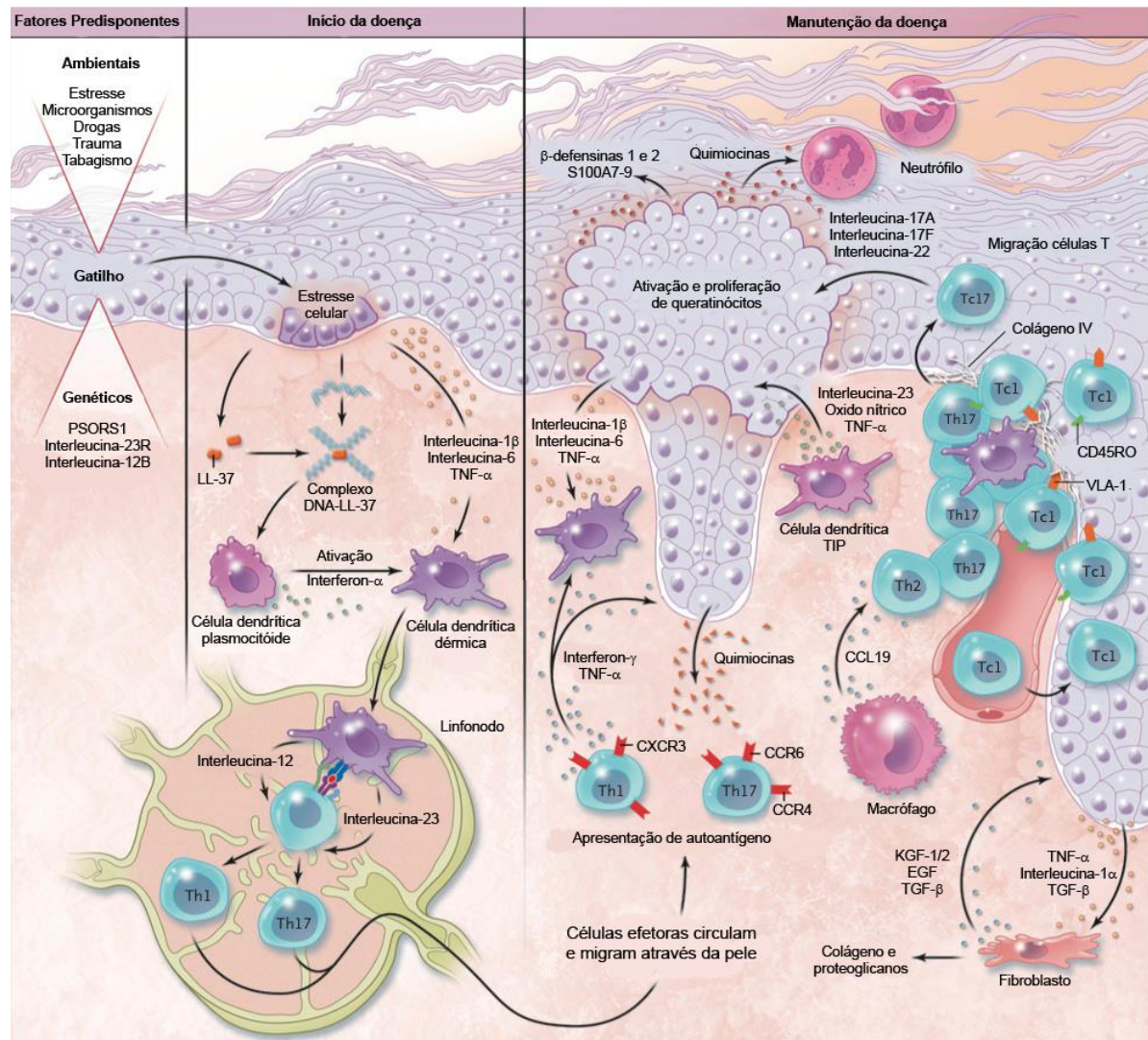


Figura 4: Formação e evolução das placas psoriáticas.
Adaptado de (NESTLE, KAPLAN e BARKER, 2009)

Finalmente, CD provenientes de lesões de psoríase ativam as células T para produzir IL-17 e IFN- γ , desse modo regulando positivamente o eixo IL-23/Th17. IL-17 interage com o IFN- γ para aumentar a síntese de citocinas pró-inflamatórias pelos queratinócitos, como IL-6 e IL-8, aumentando o influxo de células T na pele, o que contribui para a manutenção da placa psoriática. IFN- γ juntamente com TNF e IL-20 são ativadores de fatores de transcrição envolvidos no processo inflamatório como STAT-1, STAT-3 e fator nuclear κ B (NF- κ B) (LIMA EDE e LIMA MDE, 2011; PERERA, DI MEGLIO e NESTLE, 2012).

Este processo imunológico com a participação de citocinas estimuladoras, como IL-1, IL-6, IFN- γ e a presença de células T entre os queratinócitos, associa-se a uma hiperproliferação epidérmica caracterizada pelo aumento em duas vezes do número de mitoses e pela redução do ciclo dos queratinócitos em torno de oito

vezes e, conseqüentemente, uma maturação incompleta. Isso causa distúrbio da membrana plasmática e reduz a síntese de lipídios para formação dos desmossomos pelos queratinócitos. Por outro lado, os linfócitos Tc1 (CD8+) agredem o local das lesões psoriáticas pela liberação de citocinas e conseguem penetrar nos espaços intercelulares dos queratinócitos, facilitando o processo inflamatório observado na psoríase (LIMA EDE e LIMA MDE, 2011).

Manifestações histopatológicas incluem hiperplasia (aumento do número de queratinócitos) na epiderme (acantose), com diminuição ou perda do estrato granular, alongamento e engrossamento do estrato córneo (hiperqueratose) e disfunção do processo de cornificação, com queratinócitos contendo núcleo no estrato córneo (paraqueratose) e infiltração atípica de células inflamatórias na epiderme, chegando até a camada córnea. Além disso, na pele psoriática o processo de angiogênese é aumentado com a formação exagerada de novos vasos (FEINGOLD e GRUNFELD, 2012). A proliferação dos queratinócitos é mediada por fatores de crescimento, como fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator de crescimento transformante ($TGF-\alpha$ e $TGF-\beta$) e anfiregulina, e estes por sua vez, possuem a expressão aumentada na psoríase (ALBANESI, DE PITA e GIROLOMONI, 2007).

A formação de escamas, e a ruptura da barreira protetora, são causadas pela diferenciação anormal dos queratinócitos e pela falha destes em se empilharem normalmente, secretarem lipídios extracelulares e aderirem uns aos outros (LOWES, BOWCOCK e KRUEGER, 2007). Essas mudanças estão associadas com a expressão alterada de diversos componentes celulares. Na psoríase, a queratina, o principal componente dos filamentos intermediários dos queratinócitos, é expressa de forma anormal. Sendo que, entre as queratinas expressas anormalmente, K17 é bastante notável, uma vez que não é expressa normalmente na epiderme saudável, mas é altamente expressa em lesões psoriáticas (FU e WANG, 2012).

1.2.2. Terapias utilizadas no tratamento da Psoríase

Embora os estudos em busca da compreensão da psoríase tenham evoluído consideravelmente, a doença não tem cura e os tratamentos utilizados têm o

objetivo de reduzir os sinais e sintomas e modificar a progressão da doença (BAKER *et al.*, 2012). O índice de severidade e área da psoríase (PASI) é a ferramenta utilizada para avaliação da gravidade da doença e leva em consideração o eritema, a espessura e grau de descamação das lesões, bem como a área da superfície corporal envolvida. Com a utilização do PASI, as informações do comportamento evolutivo do paciente em resposta ao tratamento, podem ser calculadas (FELDMAN e KRUEGER, 2005).

As opções de tratamento tradicionais para a psoríase incluem, para os casos mais leves, terapias tópicas (corticosteróides, análogos da vitamina D e retinóides) e fototerapia (ultravioleta B (UVB) e PUVA) e para casos mais severos, terapias sistêmicas (metotrexato retinóides e ciclosporina A). No entanto, todas as terapias existentes possuem algum tipo de limitação (AFIFI *et al.*, 2005).

O tratamento tópico pode ser utilizado em monoterapia ou de forma combinada, principalmente nas formas leves da psoríase. Já nas formas moderadas a graves, quando associado à fototerapia e/ou à terapia sistêmica, pode acelerar a melhora das lesões e ocasionar maior conforto ao paciente. As substâncias queratolíticas, emolientes e umectantes sempre são incluídas no regime terapêutico, tanto alternadamente com produtos ativos, quanto nas fases assintomáticas ou até mesmo como adjuvantes (MASON *et al.*, 2013).

As principais substâncias ativas utilizadas em formulações tópicas, disponíveis no Brasil são os corticosteroides. Seus efeitos são mediados via receptor de glicocorticoide (GR), gerando efeitos anti-inflamatórios, imunossupressores, metabólicos e tóxicos. As ações anti-inflamatórias e imunossupressoras incluem a mudança na circulação e migração de leucócitos, além de alterações em funções celulares específicas como inibição da proliferação de linfócitos e função de monócitos. Os principais efeitos adversos observados são: alterações na pele (atrofia cutânea e diminuição do processo de cicatrização), osteoporose, atrofia muscular/miopatia, glaucoma, alterações do eixo hipófise-pituitária-adrenal, indução do diabetes e hipertensão (SCHACKE, DOCKE e ASADULLAH, 2002; MASON *et al.*, 2013).

Por via tópica também são utilizados análogos da vitamina D, que atuam sobre a resposta imunológica, induzindo a apoptose pela ligação aos receptores de vitamina D (TREMEZAYGUES e REICHRATH, 2011). Os inibidores de calcineurina

(pimecrolimo e tacrolimo) também são muito utilizados, principalmente de forma localizada na face, dobras e semi-mucosas por provocarem menos efeitos colaterais do que os corticosteroides e os análogos da vitamina D (AYER e YOUNG, 2013).

A fototerapia é uma opção terapêutica indicada de forma isolada ou em associação com agentes tópicos e/ou sistêmicos, com o objetivo de controlar a doença ou diminuir a dose dos medicamentos associados. Essa terapia possui ações anti-inflamatória e imunossupressora, além de ser capaz de diminuir a proliferação celular (WONG, HSU e LIAO, 2013). Pode ser com UVB de banda estreita (UVB-NB) ou com PUVA, que consiste na associação de psoraleno e radiação UVA (320-400 nm) (LAPOLLA *et al.*, 2011).

O tratamento sistêmico é representado principalmente pelo metotrexato, retinóides orais e pela ciclosporina. O metotrexato possui efeitos imunossupressores e também atua na redução da hiperproliferação de queratinócitos (MIELLER *et al.*, 2013). Os retinóides orais (acitretina e isotretinoína) são análogos sintéticos da vitamina A, e são capazes de interferir sobre o sistema imune, diferenciação e proliferação celulares. A ciclosporina é um imunossupressor citotóxico, capaz de reduzir a migração de células T e de neutrófilos (RAUT, PRABHU e PATRAVALE, 2013). O metotrexato e a ciclosporina são agentes sistêmicos eficazes, mas seu uso é limitado por causa de sua toxicidade, incluindo complicações hepáticas e renais (WARREN e GRIFFITHS, 2008).

Uma nova geração de agentes terapêuticos, chamados biológicos, derivados da tecnologia de DNA recombinante, tem sido desenvolvida nos últimos anos, porém não se conhece exatamente seus efeitos a longo prazo (TONEL e CONRAD, 2009). Esses agentes nada mais são do que proteínas recombinantes criadas por engenharia genética, incluindo: anticorpos monoclonais, proteínas de fusão ou citocinas humanas recombinantes. Nas duas primeiras categorias, estão incluídos os novos medicamentos já aprovados para o tratamento da psoríase e da artrite psoriática no Brasil. Esses compostos são capazes de bloquear, antagonizar ou neutralizar alvos específicos do processo inflamatório (KIM *et al.*, 2012). No entanto, como a psoríase é uma doença de natureza crônica, muitos pacientes requerem tratamento por um período muito longo e o alto custo do tratamento é o que pode limitar seu uso (AHN *et al.*, 2013; GARCIA-PEREZ, STEVANOVIC e POUBELLE, 2013).

A insatisfação com o tratamento atual somada às dificuldades sofridas pela queda na qualidade de vida (seja por redução de produtividade, atividade sexual, atividades sociais ou pela estigmatização e constrangimento sofrido) são as causas pelas quais pacientes com psoríase frequentemente apresentam altas taxas de depressão e comprometimento psíquico (GARCIA-PEREZ, JEAN e POULIOT, 2012).

Novas drogas estão em desenvolvimento para o tratamento de pacientes com psoríase, incluindo agonistas de receptor de adenosina A3, novos biológicos anti-TNF- α , anti-IL-17 e anti-IL 12/23, bem como agentes inibidores de fosfodiesterase 4 e inibidores de janus quinase. Entretanto, a minimização da toxicidade e aumento do custo/benefício das terapias antipsoriáticas ainda representa um grande desafio clínico em termos de tempo, custos e inconvenientes (GARCIA-PEREZ, STEVANOVIC e POUBELLE, 2013; PALFREEMAN, MCNAMEE e MCCANN, 2013).

1.3. Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) é um conjunto de peptídeos, esteróides, enzimas e receptores envolvidos especialmente no controle da pressão sanguínea e balanço hidroeletrólítico. Trata-se de um dos sistemas endócrinos mais estudados devido a sua participação na regulação cardiovascular e potencial envolvimento em mecanismos patofisiológicos de doenças cardiovasculares (STECKELINGS e CZARNELZKI, 1995).

O SRA classicamente descrito (Figura 5) consiste na síntese e liberação de renina pelos rins, através das células justaglomerulares, a partir da pró-renina, seu precursor. A renina, a qual é uma enzima proteolítica ativa, converte o angiotensinogênio em angiotensina I, no fígado. Posteriormente, no pulmão a angiotensina I (ANG I) é convertida em angiotensina II (ANG II), um octapeptídeo, pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Além de converter angiotensina I em angiotensina II, a ECA também é responsável pela degradação da bradicinina, reduzindo o nível sérico de vasodilatadores endógenos. A angiotensina I também pode ser convertida a angiotensina II por outras enzimas, como a quimase, uma

Com a evolução gradual do conhecimento, uma visão ampliada desse sistema foi sendo adquirida e sistemas tissulares locais de SRA foram identificados na maioria dos órgãos. Atualmente, os órgãos nos quais foi identificado o SRA incluem o coração (DANSER *et al.*, 1995), rins (REAMS, 1992), endotélio (PAUL, POYAN MEHR e KREUTZ, 2006), tecido adiposo (FOWLER *et al.*, 2009), fígado (PAIZIS *et al.*, 2002), sistema nervoso e cérebro (REAMS, 1992), sistema reprodutivo (LEUNG e SERNIA, 2003), trato gastrointestinal (WONG, DEBNAM e LEUNG, 2007), pâncreas (LAU, CARLSSON e LEUNG, 2004), tecido mamário (TAHMASEBI *et al.*, 2006), glândula lacrimal (YAGUCHI *et al.*, 2012) e pele (TAKEDA *et al.*, 2004). De fato, muitos órgãos como, coração, vasos sanguíneos, glândula adrenal, órgãos do sistema nervoso central, rins e outros, podem não apenas sintetizar componentes do SRA, mas também armazenar e liberar tais componentes para atingir níveis que são muito mais elevados do que em níveis plasmáticos (JUNCOS, 2013).

Aparentemente, existem dois tipos de SRA: um sistêmico e um SRA tecidual em diversos órgãos e tecidos. O SRA sistêmico é responsável pelos efeitos na regulação da pressão sanguínea e homeostase de eletrólitos (STECKELINGS *et al.*, 2004). Em contrapartida, o SRA tecidual é capaz de produzir ANG II de maneira independente do SRA sistêmico, facilitando efeitos localmente restritos, parácrinos ou autócrinos como a formação de cicatrizes após o infarto do miocárdio ou a regeneração de nervos lesionados (REINECKE *et al.*, 2003; SUN e WEBER, 2003; HOBARA *et al.*, 2010).

Por muitos anos, os efeitos da ANG II sempre estiveram relacionados somente com o efeito cardiovascular e renal. No entanto com a evolução do conhecimento, muitas outras funções adicionais foram surgindo, relacionadas com o processo inflamatório, adesão celular, fibrose e modificação da proliferação e diferenciação celular (STECKELINGS *et al.*, 2005; STAWSKI *et al.*, 2012).

Os mecanismos de ação da ANG II são decorrentes da ativação principalmente de dois receptores acoplados à proteína G distintos, receptor de angiotensina tipo 1 (AT1R) e tipo 2 (AT2R) (HUNYADY e CATT, 2006; PORRELLO, DELBRIDGE e THOMAS, 2009). O AT1R é o responsável pelas ações clássicas da ANG II, que compreendem a regulação da pressão arterial e homeostase de eletrólitos. Além disso, esse receptor está envolvido no recrutamento de células

inflamatórias, angiogênese, estresse oxidativo, proliferação celular e síntese da matriz extracelular. O AT2R possui algumas ações contrárias as do AT1R, como redução da inflamação, crescimento celular, redução de fibrose e vasodilatação. Essas ações levam a um tipo de "hipótese de ying-yang", que significa que o receptor AT2, em muitos casos compensa as ações do receptor AT1. (STECKELINGS *et al.*, 2005; BENIGNI, CASSIS e REMUZZI, 2010). Curiosamente, durante a regulação da proliferação e diferenciação celular, receptores AT1 e AT2 parecem contrapor-se mutuamente o que parece não representar uma contradição, mas sim pode indicar uma importante diferença na proporção desses dois receptores. O envolvimento da ANG II na proliferação celular cutânea é evidente, mesmo que ainda não totalmente elucidado. Pouco se sabe, porém, do envolvimento fisiológico e patológico de outras moléculas do SRA nesse órgão (PAUL, POYAN MEHR e KREUTZ, 2006).

Descoberta em 1898, por Robert Tigerstedt e Per Gunnar Bergman, a renina representa o passo limitante da formação de ANG II (MARKS e MAXWELL, 1979). É uma enzima sintetizada nos rins, armazenada e liberada nas células justaglomerulares. Pertencente à família das proteases aspárticas, consiste em 350 aminoácidos que formam dois lobos homólogos com um sítio ativo localizado na fenda de ligação entre eles. O sítio ativo possui dois resíduos de ácido aspártico que promovem alta especificidade por apenas um único substrato: o angiotensinogênio (GURUPRASAD *et al.*, 1995).

O precursor da renina, a pró-renina, é um pró-peptídeo inativo devido a um 43-aminoácido N-terminal que ocupa o local ativo e bloqueia o acesso do angiotensinogênio. Sua concentração plasmática é 10 vezes maior que a concentração de renina. A pró-renina pode ser clivada por duas vias: a proteolítica, através da enzima catepsina B, e a não-proteolítica através da exposição a um pH baixo ou ao frio, denominada ativação ácida e crioativação, respectivamente (NGUYEN e MULLER, 2010).

A renina e a pró-renina podem ativar receptores denominados receptores de pró-renina/renina (RPR) que quando ativos podem promover aumento da atividade da renina em 4 a 5 vezes, ativação da pró-renina através de mudança conformacional e também induzir uma via de sinalização não dependente do SRA (URAOKA *et al.*, 2009). Essa via é desencadeada pela ativação da proteína quinase

ativada por mitógeno (MAPK) e quinase reguladora de sinal extracelular (ERK1/2), que conduzem a uma regulação positiva do fator de crescimento transformante (TGF- β), colágeno, fibronectina, ciclo-oxigenase-2 e inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1), que ocasionam danos celulares, independente da via da angiotensina (ANG) II. Após a ligação, tanto a renina quanto a pró-renina são rapidamente internalizadas, e a pró-renina é clivada em renina (DANSER *et al.*, 1995; LIZAKOWSKI, TYLICKI e RUTKOWSKI, 2013). A expressão do RPR é reduzida através da ativação da via promielocítica dedo de zinco, que regula a transcrição de genes de forma a suprimir a expressão desses receptores. Acredita-se que esta é a via que previne os efeitos prejudiciais da ativação de RPR (SCHEFE *et al.*, 2006).

Evidências indicam que a renina parece ser a única enzima do SRA que sofre alterações em processos de proliferação celular cutânea. Sua expressão é aumentada em situações de hiperproliferação cutânea, como na psoríase (SUAREZ-FARINAS *et al.*, 2012), ou reduzida como em casos de cicatrização prejudicada por queimadura (JADHAV, SACHIN S. *et al.*, 2013).

O conceito de bloqueio do SRA existe há mais de 30 anos, sendo que esse bloqueio pode ser realizado em vários pontos do sistema. Existem muitas estratégias terapêuticas para bloquear enzimas e diminuir a concentração de angiotensina II e, conseqüentemente, reduzir a pressão arterial. (BUCZKO e HERMANOWICZ, 2008). Medicamentos que atuam no SRA são em sua maioria utilizados para o tratamento da hipertensão arterial e doenças cardiovasculares. As estratégias terapêuticas utilizadas são: inibição da ECA, bloqueio dos receptores de ANG II e inibição da renina, como demonstrado na Figura 6.

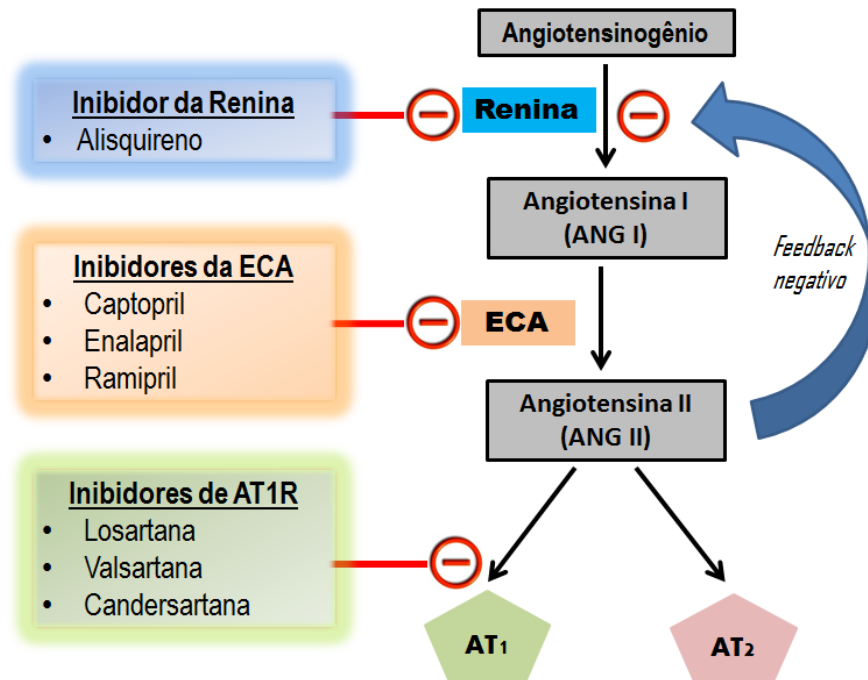


Figura 6: Estratégias de inibição do SRA
 Fonte: Adaptado de (GRADMAN e KAD, 2008)

As três classes interrompem o *feedback negativo* da ANG II na supressão de secreção de renina pelos rins (MALLAT, 2013). No entanto, as tentativas de inibir a supressão da formação de ANG II e aldosterona por IECA pode deixar de provocar os efeitos desejados na vasoconstrição e na excreção renal de sódio, já que existem vias enzimáticas alternativas que podem gerar ANG II a partir de ANG I. Os níveis de ANG II podem voltar a ser como eram antes do tratamento ou até mais elevados (SCHROTEN *et al.*, 2012).

Uma das estratégias mais recentes e que se acredita apresentar efeitos colaterais menos expressivos é a inibição da renina. Acredita-se que como a cascata de produção é interrompida no início, não ocorre acúmulo de angiotensina I no organismo, como ocorre com os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), os quais geram muitos efeitos colaterais, como: tosse, angioedema, urticária, leucopenia, perda do paladar e hipercalemia (CALDEIRA, DAVID e SAMPAIO, 2012).

1.3.1. ALISQUIRENO

O alisquireno (Rasilez[®], Novartis) é a primeira droga de uma nova classe de agentes conhecidos como inibidores de renina. Aprovado pelo FDA como anti-hipertensivo em março de 2007, inibe diretamente a enzima, a fim de diminuir a atividade plasmática da renina (YOKOKAWA, 2013).

O desenvolvimento do alisquireno (Figura 7) representa um avanço significativo na química medicinal uma vez que foi elaborado através de lógica analítica. É um inibidor competitivo da renina, não peptídico, extremamente potente com CI_{50} (concentração que inibe 50% da atividade) de 0,6 nmol/L (GRADMAN, PINTO e KAD, 2008). Esta elevada especificidade para a renina, faz com que seja pouco provável que o alisquireno produza efeitos adversos através da interação com outras enzimas. Em comparação com outros inibidores da renina, o alisquireno tem propriedades físico-químicas favoráveis com elevada solubilidade aquosa e baixa lipofilicidade, conferindo maior resistência à degradação intestinal. Possui biodisponibilidade de 2,5% após administração oral (LIZAKOWSKI, TYLICKI e RUTKOWSKI, 2013).

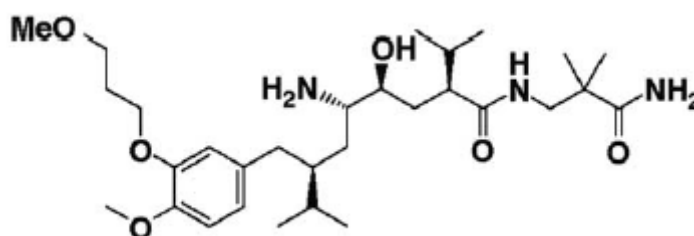


Figura 7: Fórmula estrutural do alisquireno

Fonte: (WOOD *et al.*, 2003).

O alisquireno reduz a atividade plasmática da renina e consequentemente os níveis plasmáticos de Angiotensina I e Angiotensina II em 48 horas. O pico de concentração plasmática é alcançado dentro de 1-3 horas após a administração oral, enquanto a eliminação demonstra-se lenta. A meia-vida do alisquireno em estudos realizados com única dose de 300 mg por via oral, é de 40 horas, em voluntários saudáveis (CAGNONI *et al.*, 2010). A concentração sanguínea estável da droga é alcançada após 5-8 dias de tratamento com uma dose única diária (BUCZKO e HERMANOWICZ, 2008; LIZAKOWSKI, TYLICKI e RUTKOWSKI, 2013). Aproximadamente 47 a 51% do fármaco está ligado a proteínas plasmáticas

(BUCZKO e HERMANOWICZ, 2008). A metabolização da droga em humanos é baixa (cerca de 20%), sendo que, segundo estudos *in vitro*, a principal enzima responsável por esta metabolização, parece ser a CYP3A4. O alisquireno não inibe as isoenzimas do CYP450 em ensaios realizados com concentrações de até 100 vezes a concentração máxima. Sua via de eliminação primária é a biliar (91%) na forma de droga não metabolizada (FOGARI e ZOPPI, 2010).

O alisquireno reduz os níveis plasmáticos de ANG I e ANG II, mas aumenta significativamente as concentrações plasmáticas de pró-renina e renina (LUFT e WEINBERGER, 2008). Uma preocupação relacionada a esse aumento seria que altos níveis de pró-renina e renina poderiam ativar o receptor RPR, que poderia, eventualmente, iniciar a cascata de sinalização de MAPKs, ERK1/2 e p38, os quais contribuem para a patogênese da lesão de órgãos (KANDA *et al.*, 2012). Porém, alguns estudos demonstraram que, apesar de um aumento significativo na concentração de renina, as concentrações de pró-renina e TGF- β permanecem inalterados e o alisquireno pode reduzir a expressão *in vivo* do gene do receptor de RPR (GROSS *et al.*, 2011; LIZAKOWSKI *et al.*, 2012).

Além disso, a literatura recente indica também que o aumento dos níveis de renina plasmática podem ser em parte pela presença de artefatos, onde os ensaios podem superestimar a concentração de renina em amostras de plasma (FOGARI e ZOPPI, 2010).

O alisquireno representa uma alternativa terapêutica que traz inúmeras vantagens sobre os inibidores do SRA, podendo representar uma proteção contra infartos do miocárdio, acidente vascular encefálico e talvez, também para nefropatia diabética, embora sejam necessários estudos comprobatórios adicionais (RASHIKH *et al.*, 2011). O alisquireno também parece amenizar o estresse oxidativo e prevenir a formação de lesão aterosclerótica, contribuindo para a proteção de órgãos-alvo e reduzindo as ações deletérias de ANG II e aldosterona, bem como as ações independentes de ANG II da ativação do RPR (INO *et al.*, 2009; POSS *et al.*, 2010).

Uma vez que a busca por novas alternativas terapêuticas para psoríase é uma necessidade crescente e o SRA está envolvido no processo de proliferação celular, inclusive na pele, um agente capaz de inibir a renina como o alisquireno pode representar um agente promissor no tratamento da psoríase e doenças hiperproliferativas.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiproliferativa e anti-inflamatória do alisquireno em um modelo de inflamação cutânea em camundongos.

2.1. Objetivos Específicos

- Verificar a ação do alisquireno sobre a hiperproliferação epidermal no modelo de edema de orelha induzido por aplicação múltipla de óleo de cróton (OC) através de análise histológica e imunohistoquímica.
- Verificar o efeito anti-inflamatório do alisquireno em processos inflamatórios cutâneos crônicos, através do modelo de edema de orelha mediado pela aplicação múltipla do OC em camundongos;
- Verificar a ação do alisquireno sobre a migração celular através de análise histológica e da avaliação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e n-acetil- β -D glucosaminidase (NAG);
- Verificar a ação do alisquireno sobre a produção de citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- α no modelo de edema de orelha crônico;
- Verificar o efeito do alisquireno na proliferação celular através da avaliação da proteína PCNA (Antígeno nuclear de proliferação celular) através da análise de Western Blot e imunohistoquímica;
- Avaliar os possíveis efeitos tóxicos do alisquireno em camundongos através do peso dos órgãos e avaliação da pressão sistólica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Drogas e reagentes

Para a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes drogas e reagentes: alisquireno (Rasilez[®], Novartis); 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA), ácido araquidônico, óleo de cróton (OC), Tetrametilbenzidina (TMB), p-nitrofenil-2-acetamida- β -D-glicopiranosídeo, hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (Sigma Chemical Co, EUA), dimetilformamida, acetona, formaldeído, ácido acético glacial, fosfato de sódio (Na_2HPO_4) (Merck Biosciences, Germany), albumina bovina fração V segundo Cohn (BSA) (Inlab, Brasil), peróxido de hidrogênio, álcool absoluto, eosina, hematoxilina, xilol, tween 80 (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), anticorpo primário anti-PCNA (sc- 9857) (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), anticorpo primário monoclonal anti- β -actina (A5441) (Sigma Chemical Co, EUA) e anticorpo secundário Imunoglobulina G (IgG) conjugado a peroxidase (sc-2020) e Kit revelador de cor DAB (diamino-benzidina) (BD Biosciences, CA, USA). Para administração através de gavagem (via oral), o alisquireno foi dissolvido em água para injeção e a dexametasona em solução salina 0,9%. O agente flogístico OC foi diretamente solubilizado em acetona grau P.A. e administrado por via tópica.

3.2. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (25-35 g) provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos em condições de temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração comercial. Os animais foram mantidos na sala de experimento pelo menos vinte e quatro horas antes da realização dos testes, para adaptação. Os experimentos foram realizados de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios e todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná, sob o número 726.

3.3. Inflamação cutânea induzida pela aplicação múltipla de OC e avaliação do edema de orelha

O modelo de inflamação induzida com a aplicação múltipla de OC permite avaliar a ação anti-inflamatória e antiproliferativa frente a um processo inflamatório já estabelecido. Trata-se de um modelo animal de inflamação, bastante simples e prático o qual é frequentemente aplicado de maneira satisfatória na avaliação da atividade anti-inflamatória de compostos, assim como em estudos do processo inflamatório especialmente envolvendo doenças cutâneas como dermatites e psoríase. Entre as vantagens desse modelo, destaca-se a economia da substância a ser testada, uma vez que pequenas quantidades são suficientes para aplicação por via tópica. Além disso, o modelo fornece resultados rápidos e facilmente reproduzíveis.

O edema foi expresso como o aumento da espessura (μm) da orelha dos camundongos. A espessura foi medida próxima à porção medial da orelha e registrada com o auxílio de um micrômetro digital (Eletronic Outsides Micrometer 0-25mm 0.001mm, Digimess). O edema foi avaliado pela diferença entre a medida basal e a medida após determinado tempo da indução do processo inflamatório.

O processo inflamatório foi estabelecido pela aplicação do OC topicamente na orelha direita de cada camundongo (0,4 mg/orelha em 20 μL de acetona) em dias alternados, durante 9 dias, como sugere a Figura 8.

O alisquireno nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg e o controle positivo dexametasona (3 mg/kg), foram administrados a partir do quinto dia de experimento, sendo aplicados por via oral através de gavagem, durante 4 dias consecutivos (1 ou 2 vezes ao dia) e o edema avaliado diariamente (STANLEY *et al.*, 1991). No 9º dia do experimento os animais foram eutanasiados e biópsias (círculos de 6 mm) do tecido das orelhas foram coletadas e armazenadas a -80°C para serem submetidas à análises posteriores.

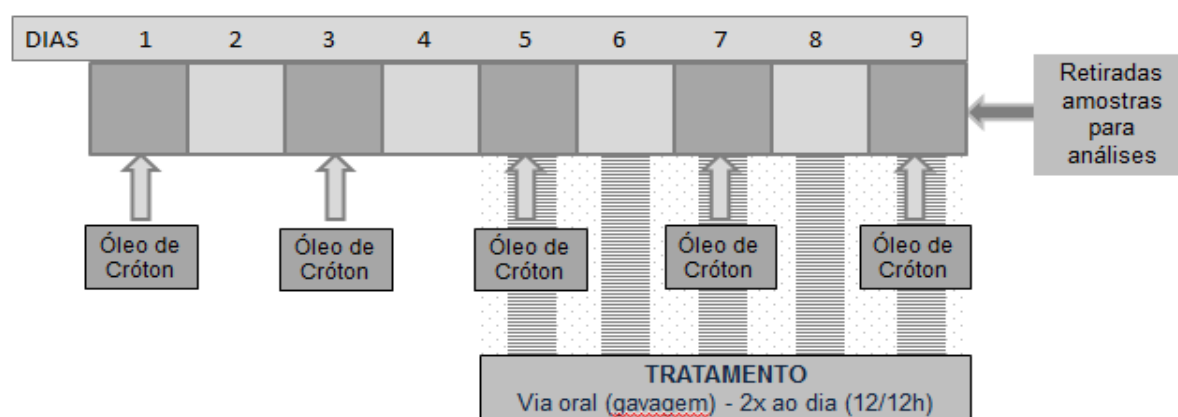


Figura 8: Desenho experimental da inflamação cutânea estabelecida através da indução com óleo de cróton (OC). O óleo de cróton (0,4 mg/orelha) foi aplicado por via tópica uma vez ao dia, em dias alternados, durante 9 dias. Os tratamentos com alisquireno (30, 100 e 300 mg/kg) ou dexametasona (fármaco de referência, 3 mg/Kg) foram administrados por via oral a partir do quinto dia a cada 12 horas.

Fonte: O autor (2013)

3.4. Avaliação da pressão arterial através de *Tail Cuff*

Uma vez que o alisquireno é um medicamento para hipertensão arterial, tornou-se interessante verificar a possível interferência do tratamento sobre a pressão arterial dos animais. Assim, no experimento descrito no item 3.3, foi realizada a avaliação da pressão arterial sistólica um dia antes do início do tratamento (dia 0), e no último dia (dia 9). A determinação da pressão ocorreu em uma sala isolada, longe de movimentação e de sons que causem perturbação no comportamento animal, climatizada em torno de 29°C. Durante três dias que antecederam o experimento, os animais foram condicionados ao contensor utilizado no procedimento. Durante esses dias, no mesmo horário no qual o experimento foi realizado, os animais permaneceram imóveis por 5 minutos no interior do contensor, simulando o que ocorreu na ocasião do experimento. Desta maneira, o animal aprende que o contensor não lhe oferece um perigo maior. Como já mencionado, esta prática diminuiu o stress causado no animal devido à imobilização, permitindo assim uma melhor coleta dos valores da pressão arterial. No dia da avaliação, os animais foram colocados no contensor, em seguida o manguito do *Tail cuff* foi posicionado na cauda do animal. Estas peças são acopladas ao registrador PowerLab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). Após um período de

30 minutos de estabilização, os valores da pressão arterial sistólica foram registrados em um computador por um software de integração (ChartPro7®) (IKEDA, NARA e YAMORI, 1991).

3.5. Toxicidade do alisquireno através da avaliação de atrofia cutânea e do peso de órgãos

Os animais foram submetidos ao tratamento com alisquireno (30, 100 e 300 mg/kg) e com a dexametasona (3 mg/kg), sem indução de processo inflamatório. Foram sete dias de tratamento, com doses administradas de 12 em 12 horas. Para avaliação da atrofia cutânea, foram avaliadas as espessuras iniciais e finais das orelhas dos camundongos. Para avaliação da toxicidade sistêmica do alisquireno, no último dia do experimento (dia 7) os animais foram eutanasiados e foram avaliados os pesos dos seguintes órgãos: baço, timo, linfonodo e adrenal.

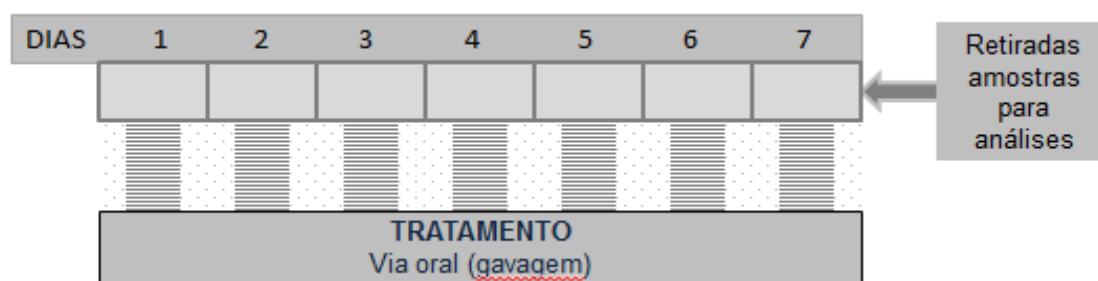


Figura 9: Desenho experimental da avaliação de toxicidade a partir do tratamento com alisquireno (30, 100 e 300 mg/kg) ou dexametasona (fármaco de referência, 3 mg/Kg). Os animais foram expostos aos tratamentos por via oral durante sete dias, a cada 12 horas.

Fonte: O autor (2013)

3.6. Avaliação da atividade enzimática da Mieloperoxidase (MPO) e da n-acetil- β -D glucosaminidase (NAG)

A determinação da atividade das enzimas MPO e NAG foi realizada conforme descrito por De Young *et al.* (DE YOUNG *et al.*, 1989). As amostras de tecido (biópsias, 6 mm) foram homogeneizadas em 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5,4 contendo 0,5% de HTAB durante 45 s a 0 °C. O homogenato foi

centrifugado a 11200 x g a 4 °C por 20 min. Para avaliação da MPO, triplicatas de 30 µL do sobrenadante foram transferidas para placas de 96 poços, onde posteriormente foram adicionados 200 µL de uma mistura contendo 100 µL de tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5.4, 85 µL de tampão fosfato de sódio (PBS) 0,22M pH 5.4 e 15 µL de peróxido de hidrogênio 0,017%. A reação foi iniciada com a adição de 20 µL de TMB 18,4 mM dissolvidos em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8 %. A placa foi então incubada a 37 °C por 3 minutos, e a reação interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio 1,46 M pH 3.0 em cada poço. A atividade da NAG foi verificada transferindo-se 25 µL do sobrenadante para cada poço de uma placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 100 µL de tampão citrato 50 mM pH 4,5. A reação foi iniciada com a adição de 25 µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina 2,24 mM. A placa foi então incubada a 37 °C durante uma hora e a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de tampão glicina 200 mM pH 10,4. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL808) com comprimento de onda de 620 ou 405 nm, para MPO ou NAG, respectivamente, sendo expressa como mDO/biópsia.

3.7. Determinação dos níveis de citocinas

Para avaliar o perfil de citocinas liberadas no processo inflamatório induzido pela aplicação do OC, as amostras foram preparadas da seguinte forma: as biópsias (6 mm) do tecido foram homogeneizadas em tampão específico (PBS, 0,05% de Tween 20, 0,1 mM de PMSF, 0,1 mM de Cloreto de benzametônio, 10 mM de EDTA, 2 µg/mL de Aprotinina, 0,5% de BSA e 0,4 M de NaCl) na proporção de 20% peso/volume e o homogenato centrifugado a 3000 g à 4 °C por 10 min, o sobrenadante foi coletado e armazenado à -70 °C. A concentração de proteínas no sobrenadante de cada amostra foi verificada pelo método de Bradford.

A determinação dos níveis de citocinas foi realizada através de kit de ensaio de imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA) (Ready-Set-Go®, eBioscience). Os anticorpos de captura respectivos para IL-6, TNF-α e IL-1α foram diluídos para a concentração de uso de acordo com o fabricante do Kit, adicionados 100 µl/poço em

placa de 96 poços e incubados overnight. Após incubação, os poços foram lavados (o conteúdo dos poços foram aspirados e lavados três vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem (PBS, 0,05% de Tween) e a placa esgotada sobre papel toalha), foi adicionado 300 µl de tampão de bloqueio (PBS, 1% BSA, 5% Sacarose, 0,05 mM NaN_3) e incubado por 1 h. A placa foi lavada (como descrito anteriormente) e as amostras (100 µl) foram incubadas. Após 2 h, a placa foi lavada e adicionado 100 µl de streptavidina diluída (1:200) em PBS + 1% de BSA em cada poço e incubado por 20 min no escuro. A placa foi lavada, incubada por 20 min no escuro com 100 µl/poço de solução substrato (TMB + H_2O_2). A reação foi encerrada com a adição de 50 µl da solução de parada (H_2SO_4 2 N). A densidade óptica foi determinada a 450 nm e a 550 nm, sendo o resultado expresso pela diferença entre a segunda e a primeira leitura.

3.8. Análise Histológica

As amostras do tecido de orelhas coletadas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de OC foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) num período de 16 horas, sendo em seguida conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. As orelhas foram posteriormente desidratadas, emblocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 µm em um micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram fotografadas em microscópio óptico, e a infiltração de leucócitos, edema e espessura da epiderme foram avaliados em áreas representativas com aumento de 200x e/ou 400x. A quantificação dos leucócitos presentes na derme foi realizada através da contagem dessas células por campo com aumento de 400x, sendo analisados 5 campos de 3 cortes histológicos distintos de três animais por grupo.

3.9. Análise Imunohistoquímica

Com essa análise, verifica-se a expressão de marcadores celulares como marcadores de proliferação e diferenciação celular. Um desses marcadores é o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) que foi descrito como marcador da atividade proliferativa. Para verificar a expressão de PCNA, amostras de orelhas de animais submetidas à aplicação múltipla de OC foram emblocadas em parafina (como descrito no item 3.5) e seccionadas em cortes de 5 µm em um micrótomo. Estes cortes histológicos foram montados em lâminas gelatinizadas. As lâminas foram submetidas a banhos de xilol para desparafinização e em seguida foram hidratadas com banhos sucessivos em concentrações de álcool decrescentes. As lâminas foram então submetidas a um banho de glicina 0,1 M para o bloqueio dos radicais aldeídos, enquanto a peroxidase endógena e os sítios inespecíficos também foram bloqueados com banhos de H₂O₂ 3% em metanol e PBS/BSA 1%, respectivamente. Os cortes foram então incubados com o anticorpo anti-PCNA (1:50) durante duas horas à temperatura ambiente em câmara úmida. Após banho com PBS, as lâminas foram novamente incubadas, desta vez com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:50) durante uma hora à temperatura ambiente e em câmara úmida. As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com kit contendo o cromógeno DAB durante 15 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas, contracoradas com hematoxilina e os cortes foram desidratados com banhos sucessivos de álcool em concentrações crescentes. A presença de células positivas para o marcador PCNA foi quantificada em áreas representativas com aumento de 400x em microscópio óptico. A quantificação foi realizada através da contagem do número de células positivas por campo, sendo analisados 5 campos de 3 cortes histológicos distintos de três animais por grupo.

3.10. Avaliação dos níveis da proteína PCNA pelo ensaio de *Western Blotting*

Com o objetivo de avaliar a proliferação celular, após a aplicação múltipla de OC, foi utilizada a técnica de *Western Blot* para quantificação da expressão da proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) na pele de camundongos.

Para tal, amostras (círculos de 6 mm de diâmetro de tecido da orelha dos camundongos) foram coletadas no nono dia após o início do tratamento com a aplicação múltipla de OC para avaliação dos níveis de PCNA.

Os extratos proteicos foram preparados como descrito anteriormente por Medeiros e colaboradores (MEDEIROS *et al.*, 2007). As amostras de tecido das orelhas dos camundongos foram congeladas e armazenadas em freezer a -80° C até o momento do uso. As biópsias foram colocadas em tampão de lise gelado (RIPA, contendo: 50 mM de TRIS-HCl (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 1% de Triton-X-100, 0,5% de deoxicolato de sódio, 0,1% de Lauril Sulfato de Sódio (SDS), 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 1 mM de fenatrolina, 1 mM de N-Ethylmaleimide (NEM) e homogeneizados por 20 s, duas vezes. Após 40 minutos em gelo, o homogenato foi centrifugado a 13.000 rpm por 30 min e o sobrenadante foi separado como a fração citosólica das preparações. A determinação da concentração de proteínas dos extratos foi realizada através do reagente de Bradford (1976) e foram submetidos à reação de Western blotting.

A fração total dos extratos de biópsias de orelhas, obtida como descrito anteriormente, foi submetida à eletroforese em gel desnaturante e SDS-poliacrilamida (12,5%), sendo logo depois transferida para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Extra Amersham Biosciences (GE Healthcare). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó (5%) e posteriormente incubada com anticorpo policlonal para PCNA (Santa Cruz Biotechnology, EUA). A visualização das proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado à peroxidase e as bandas imunorreativas foram visualizadas usando-se kit de aumento de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra) e filme radiográfico, segundo recomendações do fabricante.

3.11. Análise Estatística

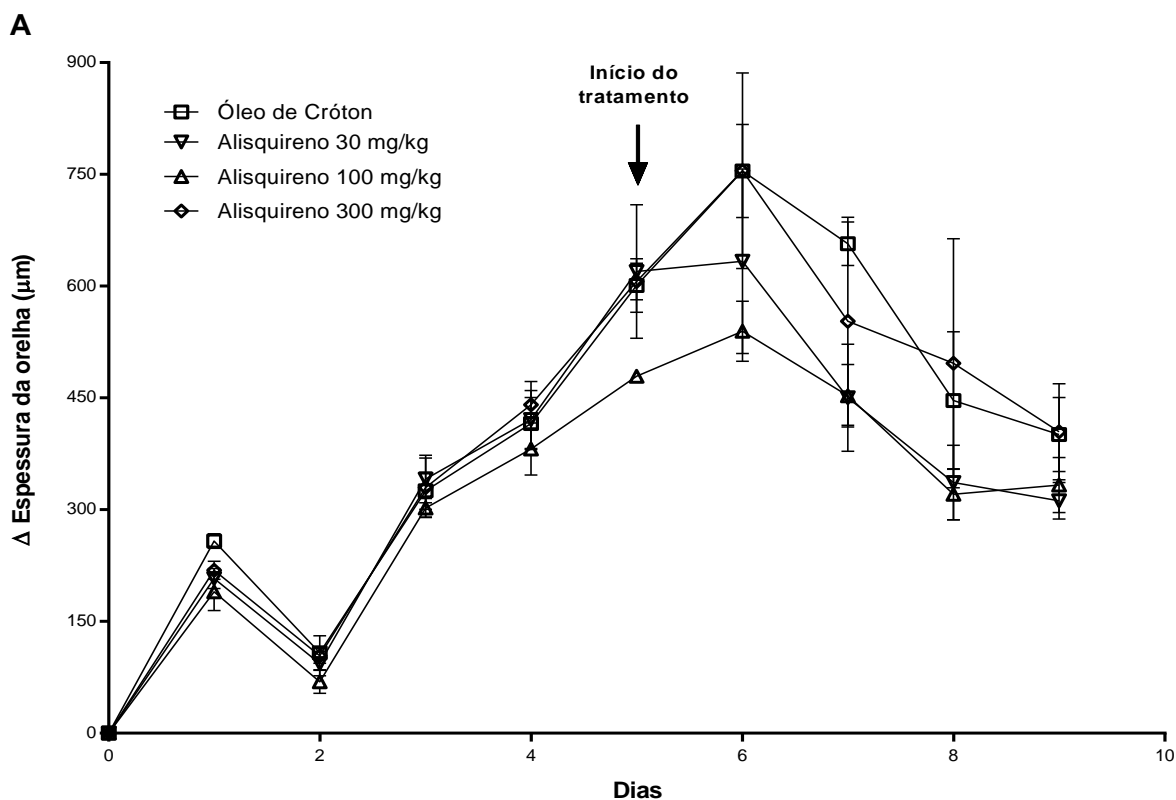
Os resultados foram apresentados como média \pm E.P.M. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma via (ANOVA), (seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls) e de duas vias (seguida do

teste *post-hoc* de Bonferroni). O nível de significância aceito para os testes foi de $P < 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism 5.0, São Diego, Califórnia, EUA.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do alisquireno no edema de orelha induzido por aplicação múltipla de OC

O edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de OC é um modelo que imita o processo inflamatório crônico, com características tais como edema, hiperproliferação da epiderme e infiltração de células mononucleares. Conforme observado na figura 10, a aplicação repetida de OC promoveu a formação de edema, verificada pelo aumento na espessura da orelha dos animais. Entretanto, após o estabelecimento do processo inflamatório, o tratamento com nenhuma das doses testadas do alisquireno foi capaz de reverter o edema (Figura 10). Pode-se observar ainda, que a partir do 6º dia, apenas o grupo tratado com dexametasona (fármaco de referência) foi capaz de reduzir o edema, com inibição máxima de 62% \pm 6,3% no 9º dia quando comparado com o grupo de controle (Figura 10B).



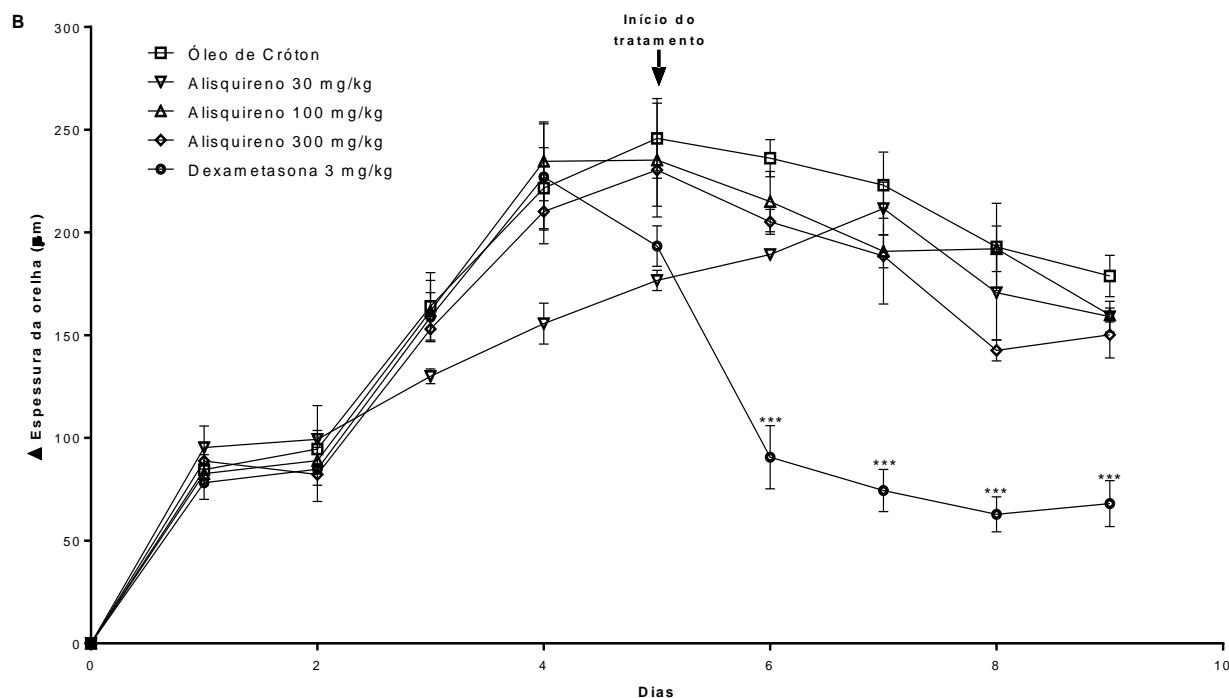


Figura 10. Efeito do alisquireno no edema induzido pela aplicação múltipla de OC. O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de OC (0,4 mg/orelha) em dias alternados durante 9 dias. O alisquireno (30, 100 ou 300 mg/kg) e a Dexametasona (3 mg/kg) foram administrados via oral durante 4 dias, 1 vez ao dia (A) ou 2 vezes ao dia (B) após o quinto dia do início da aplicação do OC e a espessura da orelha medida diariamente. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. (n=6). ***P < 0,001 representa o nível de significância em relação ao controle (OC).

4.2. Alisquireno reduz a atividade da MPO, mas não altera a atividade da NAG

A mieloperoxidase é um marcador bioquímico para verificar o recrutamento de polimorfonucleares para o local inflamado (BRADLEY *et al.*, 1982). Observa-se na figura 11 que as três doses testadas de alisquireno foram capazes de inibir a atividade da MPO de modo bastante semelhantes, com $21,2\% \pm 5,1\%$, $20,9 \pm 0,5\%$ e $21,2\% \pm 5,3\%$ de inibição para as doses de 30, 100 e 300 mg/kg, respectivamente. O mesmo foi observado com a dexametasona (3 mg/kg), que foi capaz de inibir a atividade da enzima em $71,9\% \pm 2,6\%$. Já a atividade da NAG, enzima que

representa o recrutamento de células mononucleares, não foi alterada por nenhum dos tratamentos administrados.

Para confirmar o efeito do alisquireno sobre a migração leucocitária, foi realizada a análise histológica (Figura 12) através da qual foi possível verificar que após indução do processo inflamatório com OC, os tratamentos com alisquireno propiciaram uma importante redução no infiltrado celular dérmico, quando comparado com o grupo controle, demonstrando redução do número de células infiltradas de $21,5 \pm 6,6\%$ e $19,7 \pm 4,9\%$ para as doses de 100 e 300 mg/kg, respectivamente (Figura 13).

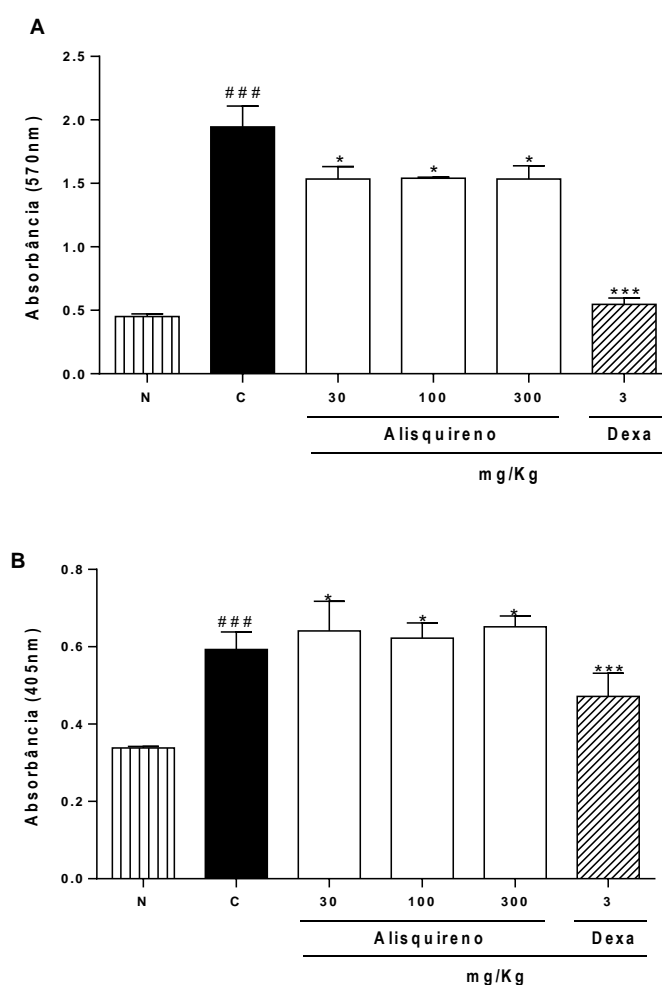


Figura 11. Efeito do alisquireno e da dexametasona, administrados por via oral, na atividade das enzimas MPO (A) e NAG (B) induzida pela aplicação múltipla de OC. O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de OC (0,4 mg/orelha) em dias alternados durante 9 dias. O alisquireno (30, 100 ou 300 mg/kg) e a Dexametasona (3 mg/kg) foram administrados por via oral durante 4 dias, 1 vez ao dia (A) ou 2 vezes ao dia (B) após o quinto dia do início da aplicação do OC e a espessura da orelha medida diariamente. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M.

(n=5). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C) e N representa o grupo não tratado. * $P<0,05$ e *** $P<0,001$. ### $P<0,001$ quando comparado ao grupo N.

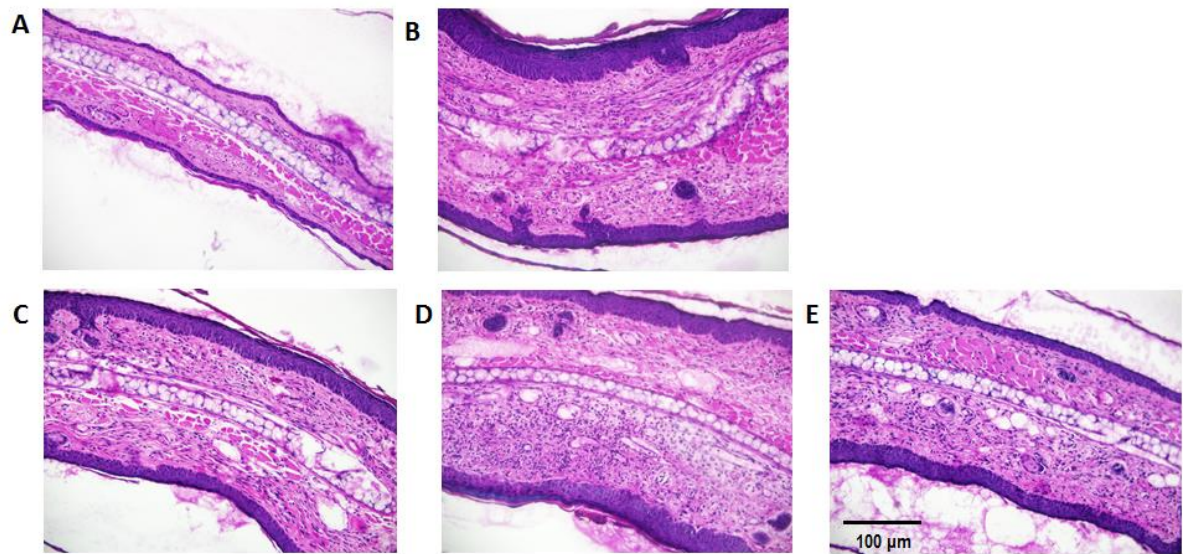


Figura 12. Fotos representativas de cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com HE após aplicação repetida de OC. (a) naïve, (b) controle, (c) tratamento com alisquireno na dose de 30 mg/kg, (d) 100 mg/kg e (e) 300 mg/kg. (200x, escala de 100 µm)

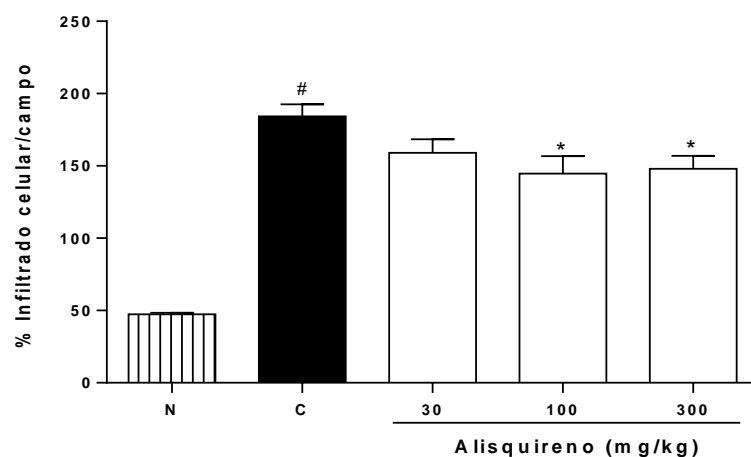


Figura 13. Efeito do alisquireno e da dexametasona, administrados por via oral, sobre a migração leucocitária induzida pela aplicação múltipla de OC. A quantificação foi realizada através da contagem dos leucócitos totais com aumento de 400x em cinco campos distintos de quatro cortes histológicos de cada grupo. As barras verticais representam a média \pm E.P.M. (n=4). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C). #, * $P<0,05$.

4.3. Alisquireno reduz os níveis de TNF- α e IL-6

Os níveis de citocinas em amostras de orelhas submetidas à aplicação de OC foram significativamente aumentados quando comparado com o grupo naive. O alisquireno promoveu uma diminuição dos níveis de IL-6 (Figura 14-A), com uma inibição máxima de $88,8 \pm 1,2\%$, no grupo tratado com a dose de 300 mg/kg, enquanto a inibição resultante do tratamento com a dexametasona foi de $92,8 \pm 0,9\%$. Os níveis de TNF- α também foram avaliados e verificou-se uma redução nos grupos tratados com as doses de 100 e 300 mg/kg, com uma inibição máxima de $45,8 \pm 2,4\%$ na dose de 300 mg/kg. A dexametasona foi capaz de inibir os níveis de TNF- α em $55,0 \pm 3,1\%$ (Figura 14-B).

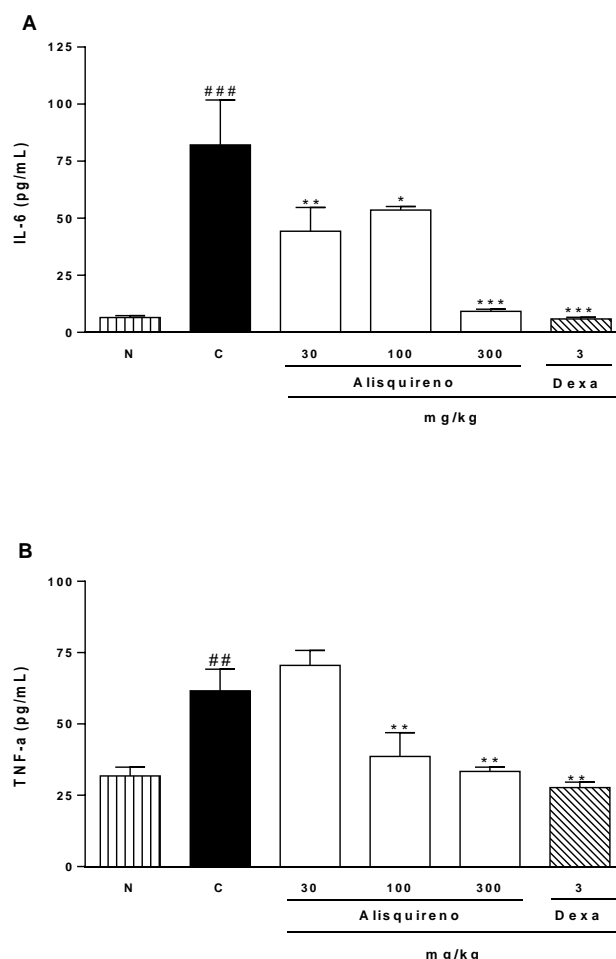


Figura 14. Dosagem das citocinas IL-6 (A) e TNF- α (B) em sobrenadante de homogenatos de orelhas tratadas topicamente com OC e posterior tratamento por via oral com alisquireno (30, 100 ou 300 mg/kg) e Dexametasona (3 mg/kg). Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. (n=5). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C) e N

representa o grupo não tratado. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$; ### $P < 0,001$ quando comparado ao grupo não tratado (N).

4.4. Alisquireno reduz o espessamento da epiderme e os níveis de PCNA

O modelo de inflamação crônica com OC induz o aumento da proliferação dos queratinócitos e consequentemente o espessamento da epiderme. Como verificado através dos cortes histológicos, o espessamento da epiderme foi reduzido nos grupos tratados com alisquireno (Figura 15).

O grupo controle (apenas com aplicação de OC) apresenta níveis aumentados de PCNA. Com a análise imunohistoquímica (Figura 16), foi possível observar a redução dos níveis de PCNA com redução de $38,5 \pm 6\%$, $28,9 \pm 9,8\%$ e $23,3 \pm 3,5\%$ nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, respectivamente. A redução do espessamento da epiderme também foi observada com inibição de $45,3 \pm 5,1\%$, $35,5 \pm 1,5\%$ e $44,7 \pm 8,1\%$ nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, respectivamente. Através da quantificação por *Western blotting*, (Figura 17) foi possível observar que os níveis de PCNA foram reduzidos, porém apenas no grupo tratado com 30 mg/kg de alisquireno.

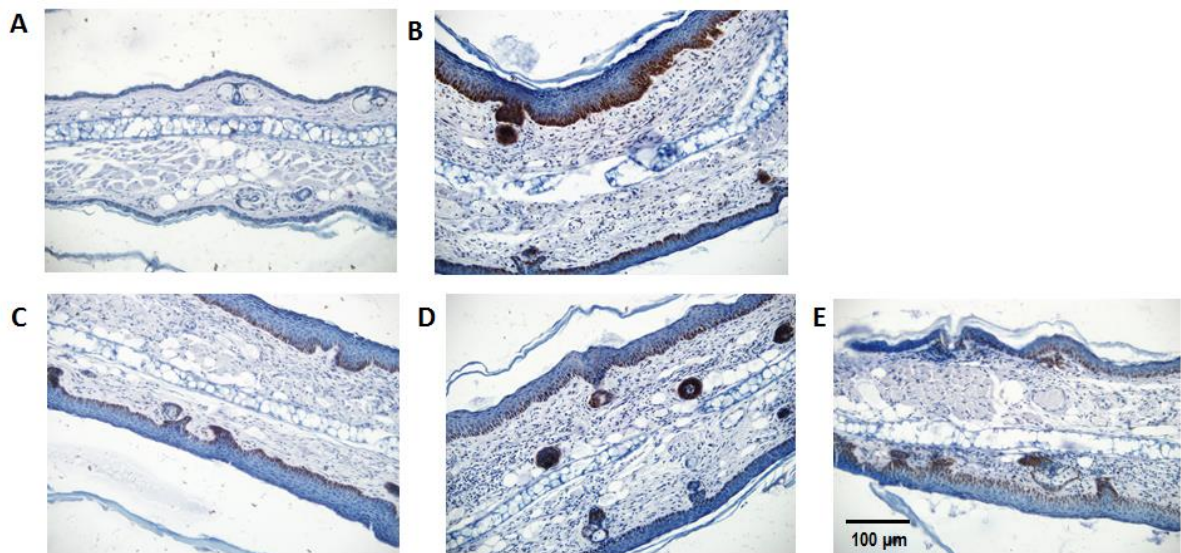


Figura 15. Fotos representativas da análise imunohistoquímica dos cortes histológicos de orelhas de camundongos, contracolorados com HE após aplicação repetida de OC. (a) naive, (b) controle, (c) tratamento com alisquireno na dose de 30 mg/kg, (d) 100 mg/kg e (e) 300 mg/kg. As células coradas em marrom são positivas para PCNA. (200x, escala de 100 μm).

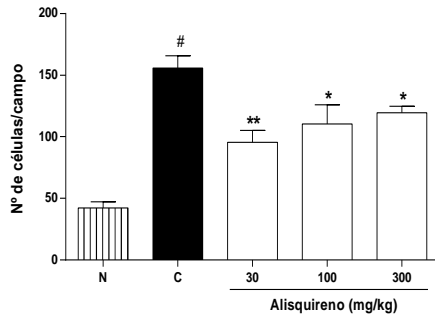
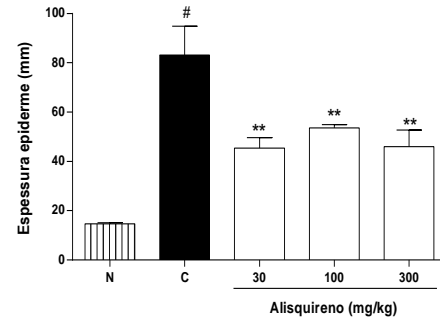
A**B**

Figura 16: Efeito do alisquireno e da dexametasona sobre a hiperproliferação epidermal induzida pela aplicação múltipla de OC. A análise foi feita através de imunohistoquímica e a quantificação realizada através da contagem das células positivas para PCNA com aumento de 400x em cinco campos distintos de quatro cortes histológicos de cada grupo. As barras verticais representam a média \pm E.P.M. (n=3). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C). *P<0,5, **P<0,01, #P<0,001.

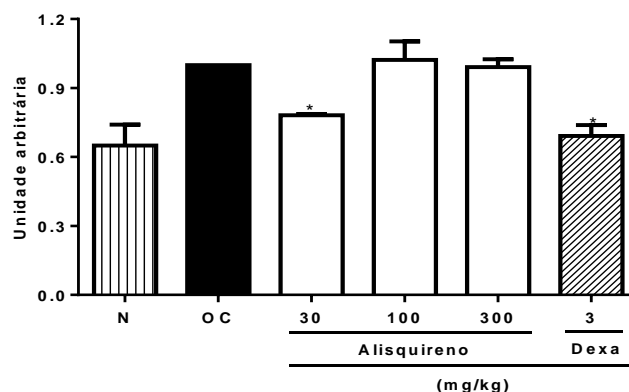
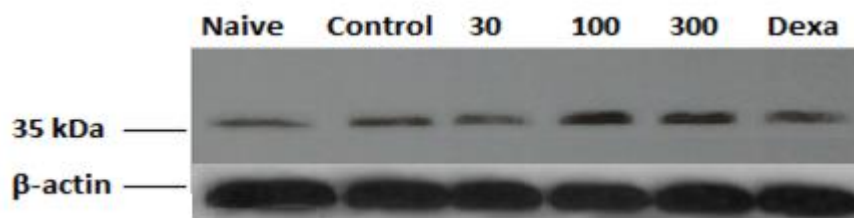
A

Figura 17. Avaliação do efeito do alisquireno nos níveis de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) em orelhas tratadas com OC. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. (n=5). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C) e N representa o grupo não tratado. * P<0,05, ** P<0,01 e *** P<0,001; ### P<0,001 quando comparado ao grupo não tratado (N).

4.5. Efeito do alisquireno na pressão sistólica

Como o alisquireno é um medicamento utilizado para o tratamento da hipertensão, foi realizada a avaliação da pressão sistólica dos animais. Essa avaliação foi avaliada no dia 0, antes da indução do processo inflamatório, e no dia 9, último dia do experimento (Figura 18). As medidas da pressão sistólica dos animais não diferiram significativamente entre os grupos controle e experimentais.

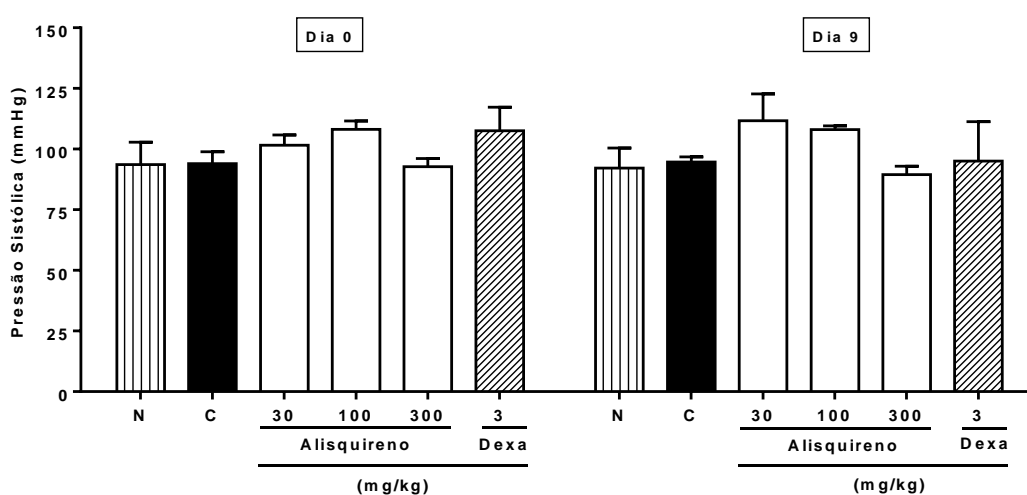


Figura 18. Efeito do alisquireno na pressão sistólica. A pressão sistólica foi verificada através do método de *tail cuff* no dia 0, antes da indução do processo inflamatório e tratamento com o alisquireno (30, 100 ou 300 mg/kg) e Dexametasona (3 mg/kg) e no último dia de experimento (dia 9). Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. (n=6).

4.6. Efeito do alisquireno em ensaio de toxicidade

Esse experimento foi realizado para a avaliação da toxicidade do alisquireno. Diferente do grupo dexametasona, nenhuma das doses testadas foi capaz de reduzir a espessura da orelha e causar atrofia cutânea. O grupo tratado com dexametasona reduziu significativamente a espessura da orelha, em aproximadamente 50 μ m, quando comparado ao grupo *naive* (Figura 19-A).

Os pesos dos órgãos linfoides e das adrenais dos grupos tratados com alisquireno não foram estatisticamente diferentes do controle, exceto o peso do baço. O peso do baço foi reduzido em todas as doses testadas, mas esta redução foi menor que a redução ocasionada pelo tratamento com dexametasona, no grupo

tratado com 300 mg/kg de alisquireno ocorreu a redução de $47,6 \pm 2,4\%$, enquanto a dexametasona (3mg/kg) reduziu $80,4 \pm 2,8 \%$ (Figura 19).

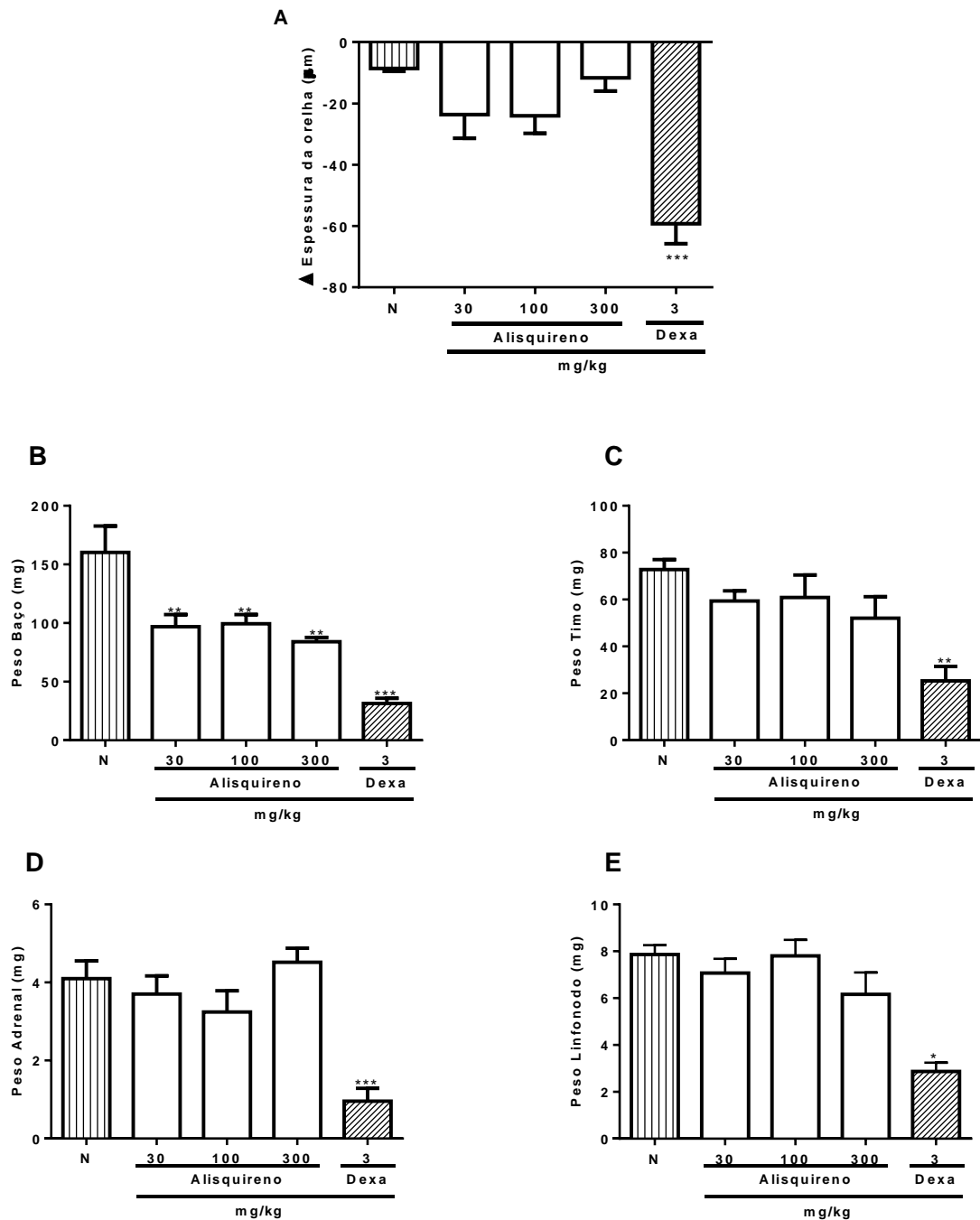


Figura 19. Avaliação da atrofia cutânea e no peso dos órgãos após tratamento com alisquireno (30, 100 e 300 mg/kg) ou Dexametasona (3 mg/kg) administrados por via oral através de gavagem por sete dias, duas vezes ao dia. A) espessura da orelha (μm); B) peso do baço; C) peso do timo; D) peso da adrenal e D) peso do linfonodo. Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo não tratado (N). (**P<0,01 e ***P<0,001).

5. DISCUSSÃO

Atualmente a psoríase é uma das doenças inflamatórias de pele mais estudadas no mundo, entretanto apesar dos esforços, a patogênese da doença ainda não é totalmente conhecida. O avanço nas pesquisas tem contribuído significativamente para a elucidação dos mecanismos e componentes envolvidos na patogenia complexa desta doença, o que tem sido de grande importância na busca de terapias realmente efetivas (WEIGLE e MCBANE, 2013).

A busca por novos tratamentos é uma necessidade inquestionável, visto que além dos efeitos adversos consideráveis e a ausência de estudos sobre efeitos a longo prazo, o alto custo e a satisfação dos pacientes também é um fator limitante para o sucesso da terapia e consequente remissão das lesões (SILVA e SILVA, 2007).

O uso *off label* de um determinado medicamento, ou seja, sua utilização para outras finalidades que não as convencionais, é uma prática bastante comum e crescente no mundo. Engloba variadas situações em que o medicamento é usado fora do preconizado pelas orientações da bula, incluindo indicações e posologias não usuais; administração do medicamento por via diferente da preconizada; administração em faixas etárias para as quais o medicamento não foi testado; e indicação terapêutica diferente da aprovada para o medicamento (RADLEY, FINKELSTEIN e STAFFORD, 2006). A pesquisa de um medicamento já comercializado para uma nova finalidade tem como vantagem a economia de tempo, já que a criação de uma nova molécula ou de um novo medicamento é um processo bastante moroso. Somado a isso, existe também o benefício do conhecimento prévio sobre segurança clínica e perfil farmacocinético do fármaco (VAZ CARNEIRO e COSTA; NOBRE, 2013).

O alisquireno é um medicamento já utilizado na prática clínica para o tratamento da hipertensão arterial. Foi aprovado em 2007 pelo FDA como um anti-hipertensivo devido a sua capacidade de promover a inibição direta da renina. Uma vez que a renina é o passo limitante e inicial da cascata de produção de ANG II, ao inibir a atividade dessa enzima, o alisquireno apresenta alta eficácia no tratamento de hipertensão primária e ainda possui a vantagem de apresentar efeitos colaterais

reduzidos, quando comparado aos medicamentos anti-hipertensivos pertencentes às demais classes (RASHIKH *et al.*, 2011; JUNCOS, 2013).

O SRA é um sistema bastante complexo e presente em muitos outros sistemas e órgãos além de rins e coração. O papel desse sistema na pele e o seu possível envolvimento em distúrbios cutâneos não está totalmente elucidado. O que se sabe até o presente momento é que a ANG II está fortemente envolvida em processos proliferativos cutâneos. Steckelings *et al.*, 2005, mostrou que tanto a ANG II como seus receptores AT1 e AT2 estão presentes na pele humana e possuem um importante papel no processo de cicatrização de feridas (STECKELINGS *et al.*, 2004; STECKELINGS *et al.*, 2005). Além disso, Takeda *et al.*, 2004, mostrou que a inibição de receptores AT1 bloqueiam a repitelização de queratinócitos e recuperação de miofibroblastos *in vitro*, no entanto a inibição de AT2 demonstrou efeitos opostos. Esses resultados sugerem que uma vez ativados, AT1 e AT2 desencadeiam sinais que de maneira oposta modulam o processo de cicatrização cutânea (TAKEDA *et al.*, 2004).

Nakai *et al.*, 2008, demonstrou que a ANG II aumenta a proliferação celular em linhagem de queratinócitos (HaCaT), tendo um possível papel na proliferação e diferenciação da epiderme, através do balanço de produção de radicais superóxido e NO (NAKAI *et al.*, 2008). Em estudo envolvendo lesões térmicas desenvolvidas por radiação e queimadura, Jadhav *et al.*, 2013, demonstrou que a expressão reduzida de renina e de receptores do SRA, podem ser uma das causas para o processo de cicatrização prolongado observado nesse tipo de lesão (JADHAV, S. S. *et al.*, 2013).

Apesar da ANG II ser o peptídeo mais importante do SRA, a renina é a responsável pelo passo limitante da cadeia de formação desse peptídeo (STECKELINGS e CZARNELZKI, 1995). Existem poucos estudos sobre as possíveis funções dessa enzima no processo de proliferação cutânea. O trabalho mais importante até o momento relacionando renina e psoríase foi o de Suarez-Fariñas *et al.*, 2012, no qual ficou demonstrado que há relevante aumento da expressão de renina em pele de pacientes com psoríase, indicando um possível envolvimento dessa enzima no processo de hiperproliferação observado na pele psoriática. Esse estudo auxilia na justificativa da escolha da renina como objeto de estudo, já que muito pouco foi investigado a respeito da função dessa enzima na pele e em especial, em pele psoriática (SUAREZ-FARINAS *et al.*, 2012).

Levando em consideração os estudos descritos anteriormente, no presente trabalho, foi avaliado o efeito do tratamento com alisquireno, um inibidor da enzima renina, nos processos de proliferação celular *in vivo*. Já existem medicamentos que atuam diretamente no SRA e que podem ter relação direta com a psoríase. Os inibidores da ECA (IECA) são uma classe de medicamentos utilizados principalmente no tratamento da hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva. Existem estudos que mostram que o captopril e o ramipril, ambos pertencentes à classe dos IECA, são capazes de aumentar e induzir a psoríase pustular generalizada (THAKOR *et al.*, 2010).

Nossos resultados comprovam que a inibição da renina com a administração de alisquireno foi capaz de diminuir parâmetros inflamatórios e proliferativos no modelo de edema de orelha induzido por OC, como a redução de níveis de citocinas pró-inflamatórias, diminuição da migração celular e do marcador de proliferação celular (PCNA).

Através do modelo de inflamação crônica induzida por OC é possível observar uma reação inflamatória prolongada caracterizada pelo aumento do peso das orelhas, infiltração de células inflamatórias e hiperplasia epidermal (RAHMAN *et al.*, 2008). Esse modelo de inflamação cutânea permite a avaliação da atividade anti-inflamatória e antiproliferativa de compostos e possui a vantagem de ser semelhante com o que ocorre na clínica, onde após o processo inflamatório instalado é que se inicia o tratamento (STANLEY *et al.*, 1991).

O OC é um agente flogístico extraído da espécie *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae) que possui como principal componente o éster de forbol denominado TPA. Nesse modelo, a aplicação por via tópica gera uma resposta inflamatória caracterizada por vasodilatação, infiltração de leucócitos polimorfonucleares para o tecido e formação de edema (GARG, RAMCHANDANI e MARU, 2008). Essa resposta inflamatória ocorre devido à ativação direta da proteína quinase C (PKC), que promove aumento nos níveis de ácido araquidônico e consequente síntese de seus metabólitos, como prostaglandinas (PG) e leucotrienos (LT), através da ativação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂). Promove, também, a indução da expressão de COX e translocação e ativação da lipoxigenase (LOX) (DENNING, 2004; CABRINI *et al.*, 2011).

A formação do edema, vasodilatação e infiltração leucocitária são decorrentes, também, da secreção e ativação de diversos mediadores imunes, como prostaglandina E_2 (PGE_2) e leucotrienos B_4 (LTB_4). O edema é um dos sinais cardinais do processo inflamatório, resultado da passagem de fluido vascular para o interstício, com o extravasamento de células e mediadores inflamatórios para o local da lesão (FÜRSTENBERGER *et al.*, 1981). Nesse trabalho, observamos que o alisquireno não altera esse parâmetro inflamatório.

Apesar do tratamento com alisquireno não reduzir o edema, houve diminuição do infiltrado celular em amostras de pele das orelhas dos camundongos, outro parâmetro diretamente relacionado com a resposta inflamatória e que pode ser observado após a aplicação do OC. Isto pôde ser verificado através da avaliação da atividade da mieloperoxidase, uma enzima encontrada nos grânulos azurofílicos de neutrófilos e de outras células de origem mielóide, que é normalmente usada como um indício de infiltração de granulócitos para o foco inflamatório (AJUEBOR, SINGH e WALLACE, 2000). Uma vez no local inflamado, os neutrófilos os quais são os primeiros tipos celulares a migrarem para a região exposta a um estímulo nocivo, são capazes de liberar diversas substâncias, entre elas, mediadores pró-inflamatórios, enzimas proteolíticas, como a MPO, e ROS (BRADLEY *et al.*, 1982; ARNHOLD, 2004). Esses mediadores liberados pelos neutrófilos são responsáveis pela sustentação do processo inflamatório agudo na placa psoriática, através da ativação de outros tipos celulares como queratinócitos e linfócitos T (TERUI, 2000). O aumento da infiltração de neutrófilos é capaz de promover a inflamação, e essa é também uma característica encontrada na psoríase (AJUEBOR, SINGH e WALLACE, 2000).

A diminuição da atividade de MPO pelo tratamento com alisquireno pode ser devido à diminuição do recrutamento de neutrófilos no tecido inflamado, bem como pela inibição da mieloperoxidase ou redução da diminuição de H_2O_2 , um substrato da MPO (ARNHOLD, 2004). Assim, tornou-se necessária uma melhor investigação acerca da possível influência do alisquireno sobre a infiltração de PMN. O efeito sobre a migração celular foi confirmada através de análises de cortes histológicos, ao inibir a migração, o alisquireno demonstra um potencial interessante como anti-inflamatório para doenças inflamatórias cutâneas, uma vez que, inibe a presença

dessas células e diminui indiretamente a resposta inflamatória local (DINARELLO, 2010).

Quando o processo inflamatório torna-se crônico o principal tipo celular observado no infiltrado celular são leucócitos mononucleares. Os macrófagos são os responsáveis pela fagocitose de restos celulares, proliferação de fibroblastos e angiogênese. Também são capazes de sintetizar e liberar ROS e citocinas como IL-10 e TGF- β (DUFFIELD, 2003). Na pele, os macrófagos são encontrados na derme saudável, mas podem migrar para os linfonodos sob algumas condições em que haja algum estímulo nocivo, entre elas, durante o estabelecimento de um processo inflamatório, como é o caso da psoríase. Uma vez nos linfonodos, promovem consequentemente, a maturação, migração e acúmulo de células dendríticas e macrófagos no tecido inflamado (NESTLE, KAPLAN e BARKER, 2009; PERERA, DI MEGLIO e NESTLE, 2012).

Os linfócitos também são personagens importantes no cenário da inflamação. Após o estímulo nocivo, os linfócitos residentes na pele são responsáveis por promover a ativação de macrófagos, levando-os a secretar proteases, eicosanóides, citocinas e espécies reativas de oxigênio, os quais irão ativar outras células formando assim um ciclo de recrutamento e ativação celular (NATHAN, 2002).

A redução da migração de macrófagos, neutrófilos e linfócitos para o sítio de inflamação por um determinado composto é importante na reversão do processo inflamatório crônico. Baseando-se na avaliação da atividade da NAG, a diminuição de leucócitos mononucleares não foi observada nesse estudo. Trata-se de uma enzima lisossômica, produzida por monócitos ativados (macrófagos) e amplamente utilizada como marcador de infiltração das células mononucleares para o foco inflamatório (BAILEY, 1988). O alisquireno, assim como a dexametasona, não foi capaz de reduzir a atividade da NAG, sugerindo que não foram capazes de reduzir a quantidade de células mononucleares no tecido inflamado.

Após o estabelecimento da resposta inflamatória, inicia-se sequencialmente a ativação de diferentes vias de sinalização que levam a resolução do processo inflamatório. Durante essa resposta de resolução, ocorre o acúmulo de um subtipo de monócitos com atividade anti-inflamatória (EHRCHEN *et al.*, 2007; BARCZYK *et al.*, 2010). Essa característica da resposta de resolução poderia justificar o fato de os

tratamentos não terem reduzido a concentração de mononucleares no tecido inflamado. Especificamente, os monócitos induzidos por glicocorticoides apresentam um elevado potencial de migração para os tecidos inflamados, onde produzem mediadores anti-inflamatórios e antioxidantes e mostram uma elevada atividade fagocítica e aumento do tempo de sobrevivência dos monócitos (TSIANAKAS *et al.*, 2012).

Por mais que os PMN não sejam os principais tipos celulares envolvidos na resposta inflamatória crônica, sua redução no tecido após o tratamento com alisquireno pode contribuir na resolução do processo inflamatório, considerando que os neutrófilos liberam ROS, alguns mediadores inflamatórios e enzimas proteolíticas (BRADLEY *et al.*, 1982; ARNHOLD, 2004). Além disso, algumas doenças crônicas como a psoríase, tem a participação ativa de neutrófilos no estabelecimento e manutenção do processo fisiopatológico da doença (NESTLE, KAPLAN e BARKER, 2009).

Outra característica observada na psoríase e também nesse modelo inflamatório crônico é o aumento da expressão de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , as quais participam ativamente no processo inflamatório cutâneo, desempenhando funções fundamentais (LEE DO *et al.*, 2009). O tratamento com o alisquireno foi capaz de reduzir os níveis das citocinas TNF- α e IL-6.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, produzida e liberada por vários tipos celulares, como células específicas dos tecidos (queratinócitos e fibroblastos) e células efectoras imunes (principalmente macrófagos e linfócitos) (LIMA EDE e LIMA MDE, 2011). Normalmente, níveis de TNF- α não são detectados em plasmas de indivíduos saudáveis, mas em doenças infecciosas e inflamatórias, bem como na psoríase, esse mediador é detectado, em níveis elevados, na pele, articulações e plasma dos pacientes (BRADLEY, 2008).

Após liberado, o TNF- α liga-se aos seus receptores, o que promove o processo inflamatório através da ativação de diversas vias de sinalização intracelulares, como a ativação de proteínas quinases e de fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a proteína ativadora AP-1. O NF- κ B pertence a uma família de fatores de transcrição que controla um grande número de genes inflamatórios capazes de induzir a produção de citocinas e quimiocinas em queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, que são responsáveis pelo

recrutamento de células T na pele (BELL *et al.*, 2003). A indução desses genes leva ainda à facilitação da entrada de células inflamatórias na pele lesionada através da indução de moléculas de adesão como E-selectina, P-selectina, ICAM-1 e VCAM-1; estimulação de queratinócitos a produzirem outros mediadores pró-inflamatórios que ativarão e induzirão outras citocinas; ou através da ativação de macrófagos e células dendríticas (YOST e GUDJONSSON, 2009).

O TNF- α tem sido considerado a citocina de maior relevância na regulação da complexa cascata inflamatória que ocorre na psoríase e em outras doenças inflamatórias. Atualmente, algumas doenças como artrite reumatóide, Doença de Crohn, artrite psoriática e psoríase podem ser tratadas com medicamentos biológicos que inibem especificamente essa citocina inflamatória. Antagonistas de TNF- α (adalimumab, etanercept e infliximab) bloqueiam a ligação da citocina ao seu receptor, interrompendo a sinalização de vias inflamatórias provocadas pelo TNF- α (LANGLEY, 2012). A aplicação tópica de TPA (componente principal do OC) é capaz de promover o aumento da síntese de TNF- α na pele (MURAKAWA *et al.*, 2006). Os resultados encontrados nesse trabalho demonstram que o tratamento com alisquireno foi capaz de reduzir de maneira significativa os níveis dessa citocina, indicando que esse composto pode atuar diretamente na inibição do TNF- α , contribuindo, dessa forma, para a redução de eventos inflamatórios desencadeados por essa citocina na placa psoriática.

Outra citocina bastante importante nesse processo é a IL-6, sintetizada e liberada em moderadas concentrações pelos queratinócitos, em condições normais (PAQUET e PIERARD, 1996). Ela pode ser produzida por vários tipos celulares, como células T, células B, monócitos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, células mesangiais, adipócitos e algumas células tumorais (MIHARA *et al.*, 2012). IL-6 está envolvida na regulação de muitos processos biológicos, incluindo o desenvolvimento dos sistemas nervoso e hematopoiético, respostas de defesa (fase aguda), inflamação e respostas imunes (HIRANO, 2010). Na pele, uma das principais consequências de sua produção é causar dano na membrana plasmática de queratinócitos, resultando em hiperproliferação epidermal observada na psoríase (LIMA EDE e LIMA MDE, 2011). Além disso, a liberação de TNF- α promove a indução direta e ativação de IL-6 (MIHARA *et al.*, 2012).

Em condições inflamatórias, a IL-6 está relacionada com a regulação da infiltração leucocitária, atuando como regulador da conversão da resposta imune inata para a resposta imune adaptativa, induzindo a mielopoese, ou seja, o processo de proliferação e diferenciação de células B, com consequente ativação e diferenciação de linfócitos T (ULICH, DEL CASTILLO e GUO, 1989; SCHELLER *et al.*, 2011). A IL-6 também é responsável pelo aumento da expressão de moléculas de adesão, tais como VCAM-1 e ICAM-1 em locais inflamados e em células endoteliais, e induz a produção de quimiocinas (MIHARA *et al.*, 2012).

Após a ligação da IL-6 ao seu receptor, inicia-se a transdução de sinal através das vias JAK/STAT (fosforilação de quinases da família da Janus quinase/transdutor de sinal e ativador de transcrição), ERK e fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). Essas vias ativam diversos mediadores inflamatórios, como o NF- κ B (SCHELLER *et al.*, 2011). A ativação de IL-6 pode ser regenerativa e protetiva durante uma infecção e inflamação. Por outro lado, a produção elevada de IL-6 contribui para a patogênese de várias doenças autoimunes e inflamatórias, através de indução da morte de células T efectoras e ativação de células T regulatórias. O Tocilizumab é o primeiro anticorpo anti-IL-6 que bloqueia essa citocina e vem sendo utilizado na tentativa de reduzir os sintomas na artrite reumatoide, em casos de não-responsividade ou intolerância ao inibidor de TNF- α (ROSE-JOHN, 2012; SMOLEN *et al.*, 2013).

Em combinação com o infiltrado inflamatório celular, ocorre também a hiperproliferação da epiderme com prematura maturação dos queratinócitos e incompleta cornificação do estrato córneo. A taxa mitótica dos queratinócitos da camada basal de um paciente com psoríase aumenta consideravelmente quando comparada a uma pele de um paciente sem a doença (NESTLE, KAPLAN e BARKER, 2009). Em modelos animais, a hiperproliferação dos queratinócitos pode ser obtida, também, através da aplicação do OC e o aumento da proliferação celular em um determinado tecido pode ser verificado através da quantificação de PCNA (STANLEY *et al.*, 1991). Este antígeno nada mais é do que um componente de complexos proteicos que é expresso durante a proliferação celular e que está localizado em compartimentos nucleares de células normais em proliferação (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2010). O tratamento com alisquireno, no modelo de inflamação cutânea induzida através da aplicação múltipla de OC, foi capaz de

reduzir as concentrações desta proteína, indicando que houve uma redução do número de células proliferativas no tecido avaliado através do método de Western Blot. O que pode ser confirmado pela imunohistoquímica, através da qual pudemos observar uma redução na expressão de PCNA na epiderme da pele de camundongos. O que se tem até o momento é que a inibição da renina pelo alisquireno pode promover o aumento de renina circulante e que essa enzima com seus níveis aumentados poderia reduzir a expressão do RPR e, uma vez que o RPR induz diferentes vias de transdução de sinal, poderia estar envolvido no processo de proliferação celular (NGUYEN *et al.*, 2002). Ou ainda, uma possível explicação para esse efeito antiproliferativo é através da inibição da ERK, uma importante via de transdução de sinal do RPR, que poderia promover a proliferação celular.

As terapias atuais para pacientes com psoríase variam bastante, dependendo da natureza das lesões (tipo, local e extensão), aceitabilidade por parte do paciente, bem como a duração do tratamento (SAMARASEKERA *et al.*, 2013). Os compostos mais utilizados para o tratamento dessa doença inflamatória crônica da pele pertencem à classe dos corticoides. Eles possuem um importante papel em doenças da pele por causa dos seus efeitos anti-inflamatórios, imunossupressores e antiproliferativos (ABIDI, AHMAD e SINGH, 2013). A duração, dosagem, regime terapêutico e escolha do corticoide apropriado devem levar em conta uma avaliação prévia do risco/benefício para o paciente. Isso porque, apesar de possuírem excelentes efeitos no tratamento da psoríase, são capazes de promover variados efeitos adversos, acometendo órgãos e sistemas, entre eles, a pele, olhos, ossos, músculos, sistemas cardiovascular, gastrointestinal e imune (SCHACKE, DOCKE e ASADULLAH, 2002).

Na pele, os principais efeitos adversos incluem atrofia cutânea epidérmica e dérmica, estrias, hipertricose, telangiectasias, púrpuras, dermatite perioral, erupções acneiformes, infecções bacterianas, virais e fúngicas, dermatite de contato e efeitos sistêmicos os quais ocorrem pela absorção percutânea após o uso prolongado com tratamento tópico (ABIDI, AHMAD e SINGH, 2013).

Além disso, o uso prolongado de corticoides pode resultar em alteração no processo de cicatrização e, também, causar atrofia cutânea, como resultado de uma redução na proliferação celular e na síntese proteica pelos queratinócitos e fibroblastos da pele (SCHACKE, DOCKE e ASADULLAH, 2002). A avaliação da

atrofia cutânea após o tratamento crônico com o alisquireno foi realizada e pode-se observar que não houve alteração desse parâmetro. A dexametasona, ao contrário, causou diminuição da espessura das orelhas dos animais.

Uma das consequências mais comuns após o uso prolongado de corticoides é desregular o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e causar algumas desordens, entre elas, insuficiência da adrenal (SCHACKE, DOCKE e ASADULLAH, 2002). Foi demonstrado em um estudo realizado por Cassano (2012), que o uso de corticoides pode levar à diminuição do peso de órgãos linfoides e atrofia da glândula adrenal (CASSANO *et al.*, 2012). Dessa forma, foi avaliada a ação do alisquireno sobre esse órgão e verificamos que não houve alteração do peso da adrenal após o tratamento crônico dos animais; no entanto, corroborando o estudo acima, a dexametasona causou redução significativa da mesma.

É sabido, também, que os corticoides são capazes de causar imunossupressão e por essa razão órgãos linfoides foram avaliados (baço, linfonodo e timo) (BASCHANT, LANE e TUCKERMANN, 2012). Estudos demonstram alteração destes órgãos após o uso de corticoides, levando conseqüentemente, ao aumento do risco de infecções (XIPING *et al.*, 2010; VASCELLARI *et al.*, 2012). De forma contrária ao encontrado com a dexametasona, os pesos do timo e linfonodos não foram alterados após o tratamento prolongado com alisquireno. Houve uma alteração do peso do baço, no entanto, não foi tão pronunciado quanto à encontrada após o tratamento com dexametasona.

Além disso, foi realizada a avaliação da pressão sistólica e verificou-se que não houve alteração dos valores da pressão sistólica dos animais em nenhum dos grupos tratados. Essa avaliação merece destaque porque o alisquireno, por ser inibidor da renina, poderia ocasionar alteração da pressão arterial, o que não seria interessante durante um possível tratamento de distúrbios cutâneos. No entanto, nenhuma diferença foi observada, sugerindo que o alisquireno parece ter uma segurança relativa quando administrado por via oral.

Com o avanço do conhecimento dos mecanismos imunológicos e da caracterização das citocinas envolvidas nesse processo inflamatório, existe maior estímulo para o desenvolvimento de pesquisas em busca de novas drogas para o controle da doença. Com bloqueio de etapas fundamentais na progressão da inflamação, novos tratamentos podem ser promissores em casos graves e

resistentes a terapêutica convencional. Com este trabalho, demonstrou-se que a renina pode estar envolvida nos processos de proliferação cutânea e que, a inibição da renina pelo alisquireno, pode representar uma importante ferramenta para o tratamento de distúrbios inflamatórios e hiperproliferativos da pele, como a psoríase.

6. CONCLUSÃO

- O alisquireno apresenta atividade anti-inflamatória quando administrado por via oral no modelo de inflamação cutânea induzido por múltiplas aplicações de OC, visto que reduz a migração de PMN e os níveis de citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6;
- O alisquireno também é capaz de reduzir a hiperplasia epidermal e aumento da expressão de PCNA em modelo de inflamação crônica induzida pela aplicação múltipla de OC, evidenciando seu efeito antiproliferativo;
- O tratamento com alisquireno demonstrou vantagens em relação aos efeitos adversos promovidos pela dexametasona, visto que não é capaz de causar atrofia cutânea e redução no peso do timo, adrenal e linfonodos;
- Os resultados alcançados nesse trabalho sugerem que o alisquireno é uma potencial ferramenta no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de distúrbios inflamatórios e hiperproliferativos da pele. Entretanto, estudos adicionais são necessários para elucidação dos possíveis mecanismos de ação e garantia da segurança.

REFERÊNCIAS

ABEL, E. A. et al. Drugs in exacerbation of psoriasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 15, n. 5, Part 1, p. 1007-1022, 1986. ISSN 0190-9622. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019096228670265X> >.

ABIDI, A.; AHMAD, F.; SINGH, S. K. A comparative clinical evaluation of once daily versus alternate day application of topical clobetasol propionate cream in psoriasis. **J Clin Diagn Res**, v. 7, n. 1, p. 100-5, Jan 2013. ISSN 2249-782X.

AFIFI, T. et al. Topical therapies for psoriasis: evidence-based review. **Can Fam Physician**, v. 51, p. 519-25, Apr 2005. ISSN 0008-350X.

AHN, C. S. et al. Cost effectiveness of biologic therapies for plaque psoriasis. **Am J Clin Dermatol**, v. 14, n. 4, p. 315-26, Aug 2013. ISSN 1175-0561.

AJUEBOR, M. N.; SINGH, A.; WALLACE, J. L. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 279, n. 1, p. G238-44, Jul 2000. ISSN 0193-1857.

ALBANESI, C.; DE PITA, O.; GIROLOMONI, G. Resident skin cells in psoriasis: a special look at the pathogenetic functions of keratinocytes. **Clin Dermatol**, v. 25, n. 6, p. 581-8, Nov-Dec 2007. ISSN 0738-081X.

ARNHOLD, J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry (Mosc)**, v. 69, n. 1, p. 4-9, Jan 2004. ISSN 0006-2979.

AYER, J.; YOUNG, H. S. Pimecrolimus for psoriasis. **Expert Opin Pharmacother**, v. 14, n. 6, p. 767-74, Apr 2013. ISSN 1744-7666.

BAILEY, P. J. Sponge implants as models. **Methods Enzymol**, v. 162, p. 327-34, 1988. ISSN 0076-6879.

BAKER, E. L. et al. Effect of Biologic Agents on Non-PASI Outcomes in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis: Systematic Review and Meta-Analyses. **Dermatol Ther (Heidelb)**, v. 2, n. 1, p. 9, Dec 2012. ISSN 2193-8210.

BAKKER, J. B.; PEPPLINKHUIZEN, L. More About the Relationship of Lithium to Psoriasis. **Psychosomatics**, v. 17, n. 3, p. 143-146, 1976. ISSN 0033-3182. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0033318276711332> >.

BARCZYK, K. et al. Glucocorticoids promote survival of anti-inflammatory macrophages via stimulation of adenosine receptor A3. **Blood**, v. 116, n. 3, p. 446-55, Jul 22 2010. ISSN 1528-0020.

BASAVARAJ, K. H. et al. The role of drugs in the induction and/or exacerbation of psoriasis. **Int J Dermatol**, v. 49, n. 12, p. 1351-61, Dec 2010. ISSN 1365-4632.

BASCHANT, U.; LANE, N. E.; TUCKERMANN, J. The multiple facets of glucocorticoid action in rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol**, v. 8, n. 11, p. 645-55, Nov 2012. ISSN 1759-4804.

BELL, S. et al. Involvement of NF- κ B signalling in skin physiology and disease. **Cellular Signalling**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2003. ISSN 0898-6568. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656802000803> >.

BENIGNI, A.; CASSIS, P.; REMUZZI, G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. **EMBO Molecular Medicine**, v. 2, n. 7, p. 247-257, 2010. ISSN 1757-4684.

BHALERAO, J.; BOWCOCK, A. M. The Genetics of Psoriasis: A Complex Disorder of the Skin and Immune System. **Human Molecular Genetics**, v. 7, n. 10, p. 1537-1545, September 1, 1998. Disponível em: <
<http://hmg.oxfordjournals.org/content/7/10/1537.full.pdf> >.

BOEHNCKE, W. H. et al. New developments in our understanding of psoriatic arthritis and their impact on the diagnosis and clinical management of the disease. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, Aug 1 2013. ISSN 1468-3083.

BOUWSTRA, J. A. et al. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Prog Lipid Res**, v. 42, n. 1, p. 1-36, Jan 2003. ISSN 0163-7827.

BOWCOCK, A. M.; KRUEGER, J. G. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 9, p. 699-711, 2005. ISSN 1474-1733. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1038/nri1689> >.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **The Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 149-160, 2008. ISSN 1096-9896. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/path.2287> >.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, v. 78, n. 3, p. 206-9, Mar 1982. ISSN 0022-202X.

BRENAUT, E. et al. Alcohol consumption and psoriasis: a systematic literature review. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 27 Suppl 3, p. 30-5, Aug 2013. ISSN 1468-3083.

BUCZKO, W.; HERMANOWICZ, J. M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of aliskiren, an oral direct renin inhibitor. **Pharmacol Rep**, v. 60, n. 5, p. 623-31, Sep-Oct 2008. ISSN 1734-1140.

CABRINI, D. A. et al. Analysis of the Potential Topical Anti-Inflammatory Activity of Averrhoa carambola L. in Mice. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2011, p. 908059, 2011. ISSN 1741-4288.

CAGNONI, F. et al. Blocking the RAAS at different levels: an update on the use of the direct renin inhibitors alone and in combination. **Vasc Health Risk Manag**, v. 6, p. 549-59, 2010. ISSN 1178-2048.

CALDEIRA, D.; DAVID, C.; SAMPAIO, C. Tolerability of angiotensin-receptor blockers in patients with intolerance to angiotensin-converting enzyme inhibitors: a systematic review and meta-analysis. **Am J Cardiovasc Drugs**, v. 12, n. 4, p. 263-77, Aug 1 2012. ISSN 1179-187X.

CANDI, E.; SCHMIDT, R.; MELINO, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 4, p. 328-40, Apr 2005. ISSN 1471-0072.

CASSANO, A. E. et al. Anatomic, hematologic, and biochemical features of C57BL/6NCrl mice maintained on chronic oral corticosterone. **Comp Med**, v. 62, n. 5, p. 348-60, Oct 2012. ISSN 1532-0820.

CASSANO, N. et al. Alcohol, psoriasis, liver disease, and anti-psoriasis drugs. **International Journal of Dermatology**, v. 50, n. 11, p. 1323-1331, 2011. ISSN 1365-4632. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05100.x> >

CHRISTOPHERS, E. Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum. **Clin Exp Dermatol**, v. 26, n. 4, p. 314-20, Jun 2001. ISSN 0307-6938.

D'ORAZIO, J. et al. UV Radiation and the Skin. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 6, p. 12222-48, 2013. ISSN 1422-0067.

DANIELSEN, K. et al. Is the prevalence of psoriasis increasing? A 30-year follow-up of a population-based cohort. **Br J Dermatol**, v. 168, n. 6, p. 1303-10, Jun 2013. ISSN 1365-2133.

DANSER, A. H. et al. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. **Circulation**, v. 92, n. 6, p. 1387-8, Sep 15 1995. ISSN 0009-7322.

DE YOUNG, L. M. et al. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v. 26, n. 3-4, p. 335-41, Mar 1989. ISSN 0065-4299.

DENNING, M. F. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 7, p. 1141-1146, 2004. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272503004308> >.

DI MEGLIO, P.; PERERA, GAYATHRI K.; NESTLE, FRANK O. The Multitasking Organ: Recent Insights into Skin Immune Function. **Immunity**, v. 35, n. 6, p. 857-869, 2011. ISSN 1074-7613.

DINARELLO, C. A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 935-50, Mar 19 2010. ISSN 1097-4172.

DUFFIELD, J. S. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. **Clin Sci (Lond)**, v. 104, n. 1, p. 27-38, Jan 2003. ISSN 0143-5221.

ECKERT, R. L. et al. Keratinocyte survival, differentiation, and death: many roads lead to mitogen-activated protein kinase. **J Invest Dermatol Symp Proc**, v. 7, n. 1, p. 36-40, Dec 2002. ISSN 1087-0024.

EHRCHEN, J. et al. Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 1265-74, Feb 1 2007. ISSN 0006-4971.

FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. Psoriasis: it's more than just the skin. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 8, p. 1427-1429, August 1, 2012 2012. Disponível em: < <http://www.jlr.org/content/53/8/1427> >.

FELDMAN, S. R.; KRUEGER, G. G. Psoriasis assessment tools in clinical trials. **Ann Rheum Dis**, v. 64 Suppl 2, p. ii65-8; discussion ii69-73, Mar 2005. ISSN 0003-4967.

FOGARI, R.; ZOPPI, A. New class of agents for treatment of hypertension: focus on direct renin inhibition. **Vascular health and risk management**, v. 6, p. 869-882, 2010. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/20957132> >.

FOWLER, J. D. et al. Renin dynamics in adipose tissue: adipose tissue control of local renin concentrations. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 2, p. E343-50, Feb 2009. ISSN 0193-1849.

FU, M.; WANG, G. Keratin 17 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis. **Journal of Dermatological Science**, v. 67, n. 3, p. 161-165, 2012. ISSN 0923-1811. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923181112001971> >.

FUCHS, E.; RAGHAVAN, S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. **Nat Rev Genet**, v. 3, n. 3, p. 199-209, Mar 2002. ISSN 1471-0056.

FÜRSTENBERGER, G. et al. Arachidonic acid and prostaglandin E2 release and enhanced cell proliferation induced by the phorbol ester TPA in a murine epidermal cell line. **Cancer Letters**, v. 11, n. 3, p. 191-198, 1981. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304383581901075> >.

GARCIA-PEREZ, M. E.; JEAN, J.; POULIOT, R. Antipsoriatic drug development: challenges and new emerging therapies. **Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov**, v. 6, n. 1, p. 3-21, Jan 2012. ISSN 1872-213X.

GARCIA-PEREZ, M. E.; STEVANOVIC, T.; POUBELLE, P. E. New therapies under development for psoriasis treatment. **Curr Opin Pediatr**, v. 25, n. 4, p. 480-7, Aug 2013. ISSN 1531-698X.

GARG, R.; RAMCHANDANI, A. G.; MARU, G. B. Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 6, p. 1249-1257, June 1, 2008. Disponível em: < <http://carcin.oxfordjournals.org/content/29/6/1249.full.pdf> >.

GNIADCKI, R. Regulation of Keratinocyte Proliferation. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 30, n. 5, p. 619-622, 1998. ISSN 0306-3623. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306362397004199> >.

GRADMAN, A. H.; KAD, R. Renin Inhibition in Hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 51, n. 5, p. 519-528, 2008. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0735109707036108> >.

GRADMAN, A. H.; PINTO, R.; KAD, R. Current concepts: renin inhibition in the treatment of hypertension. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, n. 2, p. 120-126, 2008. ISSN 1471-4892. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489208000040> >.

GRIFFITHS, C. E.; BARKER, J. N. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. **Lancet**, v. 370, n. 9583, p. 263-71, Jul 21 2007. ISSN 1474-547X.

GROSS, O. et al. Renal protective effects of aliskiren beyond its antihypertensive property in a mouse model of progressive fibrosis. **Am J Hypertens**, v. 24, n. 3, p. 355-61, Mar 2011. ISSN 1941-7225.

GURUPRASAD, K. et al. Aspartic proteinases: The structures and functions of a versatile superfamily of enzymes. **Perspectives in Drug Discovery and Design**, v. 2, n. 3, p. 329-341, 1995/07/01 1995. ISSN 0928-2866. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF02172027> >.

HIRANO, T. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**, v. 86, n. 7, p. 717-30, 2010. ISSN 1349-2896.

HOBARA, N. et al. [Regeneration of perivascular nerve and role of angiotensin receptors]. **Yakugaku Zasshi**, v. 130, n. 9, p. 1189-95, Sep 2010. ISSN 0031-6903.

HOLLINGSWORTH, J. W. et al. Ozone activates pulmonary dendritic cells and promotes allergic sensitization through a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 5, p. 1167-70, May 2010. ISSN 1097-6825.

HUNYADY, L.; CATT, K. J. Pleiotropic AT1 Receptor Signaling Pathways Mediating Physiological and Pathogenic Actions of Angiotensin II. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 5, p. 953-970, May 1, 2006. Disponível em: < <http://mend.endojournals.org/content/20/5/953.full.pdf> >.

IKEDA, K.; NARA, Y.; YAMORI, Y. Indirect systolic and mean blood pressure determination by a new tail cuff method in spontaneously hypertensive rats. **Lab Anim**, v. 25, n. 1, p. 26-9, Jan 1991. ISSN 0023-6772.

INO, J. et al. Dynamic observation of mechanically-injured mouse femoral artery reveals an antiinflammatory effect of renin inhibitor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, n. 11, p. 1858-63, Nov 2009. ISSN 1524-4636.

IRLA, N.; NAVARINI, A. A.; YAWALKAR, N. Alitretinoin abrogates innate inflammation in palmoplantar pustular psoriasis. **Br J Dermatol**, v. 167, n. 5, p. 1170-4, Nov 2012. ISSN 1365-2133.

JACOBSON, C. C.; KUMAR, S.; KIMBALL, A. B. Latitude and psoriasis prevalence. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 4, p. 870-873, 2011. ISSN 0190-9622. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962209006914> >.

JADHAV, S. S. et al. Effects of combined radiation and burn injury on the renin-angiotensin system. **Wound Repair Regen**, v. 21, n. 1, p. 131-40, Jan-Feb 2013. ISSN 1524-475X.

JADHAV, S. S. et al. Effects of combined radiation and burn injury on the renin-angiotensin system. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 1, p. 131-140, 2013. ISSN 1524-475X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1524-475X.2012.00867.x> >.

JIN, L.; WANG, G. Keratin 17: A Critical Player in the Pathogenesis of Psoriasis. **Med Res Rev**, May 30, 2013. ISSN 1098-1128.

JUNCOS, L. Direct renin inhibition: extricating facts from façades. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, March 13, 2013. Disponível em: < <http://tak.sagepub.com/content/early/2013/03/11/1753944713479995.abstract> >

KANDA, A. et al. (Pro)renin receptor is associated with angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy. **Diabetologia**, v. 55, n. 11, p. 3104-13, Nov 2012. ISSN 1432-0428.

KERN, F.; NIAULT, T.; BACCARINI, M. Ras and Raf pathways in epidermis development and carcinogenesis. **Br J Cancer**, v. 104, n. 2, p. 229-34, Jan 18 2011. ISSN 1532-1827.

KIM, I. H. et al. Comparative efficacy of biologics in psoriasis: a review. **Am J Clin Dermatol**, v. 13, n. 6, p. 365-74, Dec 1 2012. ISSN 1175-0561.

KOSTER, M. I.; ROOP, D. R. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. **Eur J Cell Biol**, v. 83, n. 11-12, p. 625-9, Dec 2004. ISSN 0171-9335.

KRUEGER, G.; ELLIS, C. N. Psoriasis--recent advances in understanding its pathogenesis and treatment. **J Am Acad Dermatol**, v. 53, n. 1 Suppl 1, p. S94-100, Jul 2005. ISSN 1097-6787.

LANGLEY, R. G. Effective and sustainable biologic treatment of psoriasis: what can we learn from new clinical data? **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 26 Suppl 2, p. 21-9, Mar 2012. ISSN 1468-3083.

LAPOLLA, W. et al. A review of phototherapy protocols for psoriasis treatment. **J Am Acad Dermatol**, v. 64, n. 5, p. 936-49, May 2011. ISSN 1097-6787.

LATKOWSKI, J. M.; FREEDBERG, I. M.; BLUMENBERG, M. Keratinocyte growth factor and keratin gene regulation. **J Dermatol Sci**, v. 9, n. 1, p. 36-44, Jan 1995. ISSN 0923-1811.

LAU, T.; CARLSSON, P. O.; LEUNG, P. S. Evidence for a local angiotensin-generating system and dose-dependent inhibition of glucose-stimulated insulin release by angiotensin II in isolated pancreatic islets. **Diabetologia**, v. 47, n. 2, p. 240-8, Feb 2004. ISSN 0012-186X.

LEE DO, Y. et al. Anti-inflammatory effects of Asparagus cochinchinensis extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **J Ethnopharmacol**, v. 121, n. 1, p. 28-34, Jan 12 2009. ISSN 0378-8741.

LEUNG, P. S.; SERNIA, C. The renin-angiotensin system and male reproduction: new functions for old hormones. **J Mol Endocrinol**, v. 30, n. 3, p. 263-70, Jun 2003. ISSN 0952-5041.

LI, Y.; BEGOVICH, A. B. Unraveling the genetics of complex diseases: susceptibility genes for rheumatoid arthritis and psoriasis. **Semin Immunol**, v. 21, n. 6, p. 318-27, Dec 2009. ISSN 1096-3618.

LIMA EDE, A.; LIMA MDE, A. Reviewing concepts in the immunopathogenesis of psoriasis. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 6, p. 1151-8, Nov-Dec 2011. ISSN 1806-4841.

LIU, T. et al. Measurements of Radiation-Induced Skin Changes in Breast-Cancer Radiation Therapy Using Ultrasonic Imaging. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc**, v. 2, p. 718-722, May 27 2008. ISSN 1557-170X.

LIZAKOWSKI, S. et al. Aliskiren and perindopril reduce the levels of transforming growth factor-beta in patients with non-diabetic kidney disease. **Am J Hypertens**, v. 25, n. 6, p. 636-9, Jun 2012. ISSN 1941-7225.

LIZAKOWSKI, S.; TYLICKI, L.; RUTKOWSKI, B. Direct renin inhibition--a promising strategy for renal protection? **Med Sci Monit**, v. 19, p. 451-7, 2013. ISSN 1643-3750.

LOWES, M. A.; BOWCOCK, A. M.; KRUEGER, J. G. Pathogenesis and therapy of psoriasis. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 866-873, 2007. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature05663> >.

LUFT, F. C.; WEINBERGER, M. H. Antihypertensive therapy with aliskiren. **Kidney Int**, v. 73, n. 6, p. 679-83, Mar 2008. ISSN 1523-1755.

MA, T. K. et al. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. **Br J Pharmacol**, v. 160, n. 6, p. 1273-92, Jul 2010. ISSN 1476-5381.

MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C. C. The skin as a mirror of the aging process in the human organism – State of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2). **Experimental Gerontology**, v. 42, n. 9, p. 879-886, 2007. ISSN 0531-5565. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0531556507001635> >.

MALLAT, S. G. Dual renin-angiotensin system inhibition for prevention of renal and cardiovascular events: do the latest trials challenge existing evidence? **Cardiovasc Diabetol**, v. 12, n. 1, p. 108, Jul 19 2013. ISSN 1475-2840.

MARKS, L. S.; MAXWELL, M. H. Tigerstedt and the discovery of renin. An historical note. **Hypertension**, v. 1, n. 4, p. 384-8, Jul-Aug 1979. ISSN 0194-911X.

MASON, A. R. et al. Topical Treatments for Chronic Plaque Psoriasis of the Scalp: a Systematic Review. **Br J Dermatol**, Jun 24 2013. ISSN 1365-2133.

MEDEIROS, R. et al. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **European Journal of Pharmacology**, v. 559, n. 2-3, p. 227-235, 2007. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299906014014> >.

MIHARA, M. et al. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clin Sci (Lond)**, v. 122, n. 4, p. 143-59, Feb 2012. ISSN 1470-8736.

MIHELLER, P. et al. Methotrexate: Should We Start Using it in Clinical Practice? **Curr Drug Targets**, May 6 2013. ISSN 1873-5592.

MUMOLI, N. et al. Erythrodermic psoriasis. **QJM**, Jun 22 2013. ISSN 1460-2393.

MURAKAWA, M. et al. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochem Pharmacol**, v. 71, n. 9, p. 1331-6, Apr 28 2006. ISSN 0006-2952.

NAKAI, K. et al. Angiotensin II enhances EGF receptor expression levels via ROS formation in HaCaT cells. **J Dermatol Sci**, v. 51, n. 3, p. 181-9, Sep 2008. ISSN 0923-1811.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846-52, Dec 19-26 2002. ISSN 0028-0836.

NESTLE, F. O.; KAPLAN, D. H.; BARKER, J. Psoriasis. **N Engl J Med**, v. 361, n. 5, p. 496-509, Jul 30 2009. ISSN 1533-4406.

NGUYEN, G. et al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. **J Clin Invest**, v. 109, n. 11, p. 1417-27, Jun 2002. ISSN 0021-9738.

NGUYEN, G.; MULLER, D. N. The biology of the (pro)renin receptor. **J Am Soc Nephrol**, v. 21, n. 1, p. 18-23, Jan 2010. ISSN 1533-3450.

NICKOLOFF, B. J. Cracking the cytokine code in psoriasis. **Nat Med**, v. 13, n. 3, p. 242-244, 2007. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm0307-242> >.

NOBRE, P. F. [Off-label prescriptions in Brazil and in the US: legal aspects and paradoxes]. **Cien Saude Colet**, v. 18, n. 3, p. 847-54, Mar 2013. ISSN 1678-4561.

PAIZIS, G. et al. Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. **Gastroenterology**, v. 123, n. 5, p. 1667-76, Nov 2002. ISSN 0016-5085.

PALFREEMAN, A. C.; MCNAMEE, K. E.; MCCANN, F. E. New developments in the management of psoriasis and psoriatic arthritis: a focus on apremilast. **Drug Des Devel Ther**, v. 7, p. 201-10, 2013. ISSN 1177-8881.

PAQUET, P.; PIERARD, G. E. Interleukin-6 and the skin. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 109, n. 4, p. 308-17, Apr 1996. ISSN 1018-2438.

PAUL, M.; POYAN MEHR, A.; KREUTZ, R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 3, p. 747-803, July 2006. Disponível em: < <http://physrev.physiology.org/content/86/3/747.abstract> >.

PERERA, G. K.; DI MEGLIO, P.; NESTLE, F. O. Psoriasis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 7, n. 1, p. 385-422, 2012. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-pathol-011811-132448> >.

PORRELLO, E. R.; DELBRIDGE, L. M.; THOMAS, W. G. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor. **Front Biosci**, v. 14, p. 958-72, 2009. ISSN 1093-4715.

POSS, J. et al. The renin inhibitor aliskiren upregulates pro-angiogenic cells and reduces atherogenesis in mice. **Basic Res Cardiol**, v. 105, n. 6, p. 725-35, Nov 2010. ISSN 1435-1803.

POTOK, O.; PRAJAPATI, V.; BARANKIN, B. Dermacase. Can you identify this condition? Guttate psoriasis. **Can Fam Physician**, v. 57, n. 1, p. 55-7, Jan 2011. ISSN 1715-5258.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J.-M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1063-1072, 2008. ISSN 1600-0625. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x> >.

RADLEY, D. C.; FINKELSTEIN, S. N.; STAFFORD, R. S. Off-label prescribing among office-based physicians. **Arch Intern Med**, v. 166, n. 9, p. 1021-6, May 8 2006. ISSN 0003-9926.

RAHMAN, S. et al. Topically applied vitamin E prevents massive cutaneous inflammatory and oxidative stress responses induced by double application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in mice. **Chem Biol Interact**, v. 172, n. 3, p. 195-205, Apr 15 2008. ISSN 0009-2797.

RASHIKH, A. et al. Protective effects of aliskiren in doxorubicin-induced acute cardiomyopathy in rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, n. 2, p. 102-109, February 1, 2011. Disponível em: < <http://het.sagepub.com/content/30/2/102.abstract> >.

RAUT, A. S.; PRABHU, R. H.; PATRAVALE, V. B. Psoriasis clinical implications and treatment: a review. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, v. 30, n. 3, p. 183-216, 2013. ISSN 2162-660X.

REAMS, G. P. Angiotensin-converting enzyme in renal and cerebral tissue and implications for successful blood pressure management. **Am J Cardiol**, v. 69, n. 10, p. 59C-64C, Apr 2 1992. ISSN 0002-9149.

REINECKE, K. et al. Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: role of the AT2 receptor and the transcription factor NF-kappaB. **FASEB J**, v. 17, n. 14, p. 2094-6, Nov 2003. ISSN 1530-6860.

ROSE-JOHN, S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. **Int J Biol Sci**, v. 8, n. 9, p. 1237-47, 2012. ISSN 1449-2288.

SABAT, R. et al. Three decades of psoriasis research: where has it led us? **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 6, p. 504-509, 2007. ISSN 0738-081X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X07001460> >.

SAMARASEKERA, E. J. et al. Topical therapies for the treatment of plaque psoriasis: systematic review and network meta-analyses. **Br J Dermatol**, v. 168, n. 5, p. 954-67, May 2013. ISSN 1365-2133.

SCHACKE, H.; DOCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol Ther**, v. 96, n. 1, p. 23-43, Oct 2002. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12441176> >.

SCHEFE, J. H. et al. A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein. **Circ Res**, v. 99, n. 12, p. 1355-66, Dec 8 2006. ISSN 1524-4571.

SHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 5, p. 878-88, May 2011. ISSN 0006-3002.

SCHÖN, M. P.; BOEHNCKE, W.-H. Psoriasis. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 18, p. 1899-1912, 2005. Disponível em: < <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra041320> >.

SCHON, M. P.; BOEHNCKE, W. H. Psoriasis. **N Engl J Med**, v. 352, n. 18, p. 1899-912, May 5 2005. ISSN 1533-4406.

SCHROTEN, N. F. et al. New roles for renin and prorenin in heart failure and cardiorenal crosstalk. **Heart Fail Rev**, v. 17, n. 2, p. 191-201, Mar 2012. ISSN 1573-7322.

SILVA, K. D. S.; SILVA, E. A. T. D. Psoríase e sua relação com aspectos psicológicos, stress e eventos da vida. **Estudos de Psicologia (Campinas)**, v. 24, p. 257-266, 2007. ISSN 0103-166X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-166X2007000200012&nrm=iso >.

SMOLEN, J. S. et al. Consensus statement on blocking the effects of interleukin-6 and in particular by interleukin-6 receptor inhibition in rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions. **Ann Rheum Dis**, v. 72, n. 4, p. 482-92, Apr 2013. ISSN 1468-2060.

STANLEY, P. L. et al. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacol**, v. 4, n. 4, p. 262-71, 1991. ISSN 10110283.

STAWSKI, L. et al. Angiotensin II induces skin fibrosis: a novel mouse model of dermal fibrosis. **Arthritis Res Ther**, v. 14, n. 4, p. R194, Aug 22 2012. ISSN 1478-6362.

STECKELINGS, U. M.; CZARNELZKI, B. M. The renin-angiotensin-system in the skin. **Experimental Dermatology**, v. 4, n. 6, p. 329-334, 1995. ISSN 1600-0625. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0625.1995.tb00056.x> >.

STECKELINGS, U. M. et al. Differential expression of angiotensin receptors in human cutaneous wound healing. **British Journal of Dermatology**, v. 153, n. 5, p. 887-893, 2005. ISSN 1365-2133. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06806.x> >.

STECKELINGS, U. M. et al. Human skin: source of and target organ for angiotensin II. **Experimental Dermatology**, v. 13, n. 3, p. 148-154, 2004. ISSN 1600-0625. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.0906-6705.2004.0139.x> >.

SUAREZ-FARINAS, M. et al. Expanding the Psoriasis Disease Profile: Interrogation of the Skin and Serum of Patients with Moderate-to-Severe Psoriasis. **J Invest Dermatol**, v. 132, n. 11, p. 2552-2564, 2012. ISSN 0022-202X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2012.184> >.

SUN, Y.; WEBER, K. T. RAS and connective tissue in the heart. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 35, n. 6, p. 919-31, Jun 2003. ISSN 1357-2725.

SZEVERENYI, I. et al. The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. **Hum Mutat**, v. 29, n. 3, p. 351-60, Mar 2008. ISSN 1098-1004.

TAHMASEBI, M. et al. Localisation of renin-angiotensin system (RAS) components in breast. **Br J Cancer**, v. 95, n. 1, p. 67-74, Jul 3 2006. ISSN 0007-0920.

TAKEDA, H. et al. Effects of Angiotensin II Receptor Signaling during Skin Wound Healing. **The American journal of pathology**, v. 165, n. 5, p. 1653-1662, 2004. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010634220?showall=true> >.

TERUI, T. Inflammatory and immune reactions associated with stratum corneum and neutrophils in sterile pustular dermatoses. **Tohoku J Exp Med**, v. 190, n. 4, p. 239-48, Apr 2000. ISSN 0040-8727.

THAKOR, P. et al. Ramipril-induced generalized pustular psoriasis: case report and literature review. **Am J Ther**, v. 17, n. 1, p. 92-5, Jan-Feb 2010. ISSN 1536-3686.

TOBIN, D. J. Biochemistry of human skin--our brain on the outside. **Chem Soc Rev**, v. 35, n. 1, p. 52-67, Jan 2006. ISSN 0306-0012.

TONEL, G.; CONRAD, C. Interplay between keratinocytes and immune cells—Recent insights into psoriasis pathogenesis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 5, p. 963-968, 2009. ISSN 1357-2725. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135727250800438X> >.

TREMEZAYGUES, L.; REICHRATH, J. Vitamin D analogs in the treatment of psoriasis: Where are we standing and where will we be going? **Dermatoendocrinol**, v. 3, n. 3, p. 180-6, Jul 2011. ISSN 1938-1980.

TSIANAKAS, A. et al. Induction of an anti-inflammatory human monocyte subtype is a unique property of glucocorticoids, but can be modified by IL-6 and IL-10. **Immunobiology**, v. 217, n. 3, p. 329-35, Mar 2012. ISSN 1878-3279.

ULICH, T. R.; DEL CASTILLO, J.; GUO, K. Z. In vivo hematologic effects of recombinant interleukin-6 on hematopoiesis and circulating numbers of RBCs and WBCs. **Blood**, v. 73, n. 1, p. 108-10, Jan 1989. ISSN 0006-4971.

URAOA, M. et al. Prorenin induces ERK activation in endothelial cells to enhance neovascularization independently of the renin-angiotensin system. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 390, n. 4, p. 1202-7, Dec 25 2009. ISSN 1090-2104.

VASCELLARI, M. et al. Evaluation of thymus morphology and serum cortisol concentration as indirect biomarkers to detect low-dose dexamethasone illegal treatment in beef cattle. **BMC Vet Res**, v. 8, p. 129, 2012. ISSN 1746-6148.

VAZ CARNEIRO, A.; COSTA, J. A prescrição fora das indicações aprovadas (off-label): prática e problemas. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, n. 0, ISSN 0870-2551. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0870255113001315> >.

WARREN, R. B.; GRIFFITHS, C. E. Systemic therapies for psoriasis: methotrexate, retinoids, and cyclosporine. **Clin Dermatol**, v. 26, n. 5, p. 438-47, Sep-Oct 2008. ISSN 0738-081X.

WEBER, K. T. Aldosterone in Congestive Heart Failure. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 23, p. 1689-1697, 2001. Disponível em: <
<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra000050> >.

WEIGLE, N.; MCBANE, S. Psoriasis. **Am Fam Physician**, v. 87, n. 9, p. 626-33, May 1 2013. ISSN 1532-0650.

WOHLRAB, J. et al. Recommendations for detection of individual risk for comorbidities in patients with psoriasis. **Arch Dermatol Res**, v. 305, n. 2, p. 91-8, Mar 2013. ISSN 1432-069X.

WONG, T.; HSU, L.; LIAO, W. Phototherapy in psoriasis: a review of mechanisms of action. **J Cutan Med Surg**, v. 17, n. 1, p. 6-12, Jan-Feb 2013. ISSN 1203-4754.

WONG, T. P.; DEBNAM, E. S.; LEUNG, P. S. Involvement of an enterocyte renin-angiotensin system in the local control of SGLT1-dependent glucose uptake across the rat small intestinal brush border membrane. **J Physiol**, v. 584, n. Pt 2, p. 613-23, Oct 15 2007. ISSN 0022-3751.

WOOD, J. M. et al. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 308, n. 4, p. 698-705, 2003. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X03014517> >.

XIPING, Z. et al. Effects of dexamethasone and Salvia miltiorrhizae on the small intestine and immune organs of rats with severe acute pancreatitis. **Inflammation**, v. 33, n. 4, p. 259-66, Aug 2010. ISSN 1573-2576.

YAGUCHI, S. et al. Presence and physiologic function of the renin-angiotensin system in mouse lacrimal gland. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 53, n. 9, p. 5416-25, 2012. ISSN 1552-5783.

YOKOKAWA, F. Recent progress on the discovery of non-peptidic direct renin inhibitors for the clinical management of hypertension. **Expert Opin Drug Discov**, v. 8, n. 6, p. 673-90, Jun 2013. ISSN 1746-045X.

YOST, J.; GUDJONSSON, J. E. The role of TNF inhibitors in psoriasis therapy: new implications for associated comorbidities. **F1000 Med Rep**, v. 1, 2009. ISSN 1757-5931.